Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg
(Lehrstuhl für klinische Virologie und Immunbiologie)
Vorstand: Prof. Dr. V. Ter Meulen

DIE ABSPALTUNG VON N-ACETYLNEURAMINSÄURE DURCH NEURAMINIDASEN DER SENDAI – VIREN (PARAINFLUENZA TYP 1) UND VIBRIO CHOLERAE AUS DEN SUBSTRATEN FETUIN UND MPN (2-(3'-METHOXYPHENYL) - N -ACETYL-NEURAMINSÄURE

INAUGURAL–DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur Erlangung der medizinschen Doktorwürde

vorgelegt von
Volker Stock
aus Northeim/Han.

Würzburg, den 21. 12. 1979

1980

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg
(Lehrstuhl für klinische Virologie und Immunbiologie)
Vorstand: Prof. Dr. V. Ter Meulen

DIE ABSPALTUNG VON N-ACETYLNEURAMINSÄURE DURCH NEURAMINIDASEN DER SENDAI – VIREN (PARAINFLUENZA TYP 1) UND VIBRIO CHOLERAE AUS DEN SUBSTRATEN FETUIN UND MPN (2-(3'-METHOXYPHENYL) - N -ACETYL-NEURAMINSÄURE

INAUGURAL–DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur Erlangung der medizinschen Doktorwürde

vorgelegt von

Volker Stock

aus Northeim/Han.

Würzburg, den 21. 12. 1979

Referent: Prof. Dr. V. ter Meulen

Korreferent: Prof. Dr. K. Koschel

Dekan: Prof. Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Mai 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

I N H A L T

1. Einleitung

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.2. Methoden

2.2.1. Fetuin Test

2.2.2. Folin (MPN) Test

2.2.3. Präzipitat (MPN) Test

2.2.4. Hämagglutinationstest

3. Ergebnisse

3.1. Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Menge an Bakterien- und Virusneuraminidase

3.2. Abspaltung von Acetylneuraminsäure aus den Substraten Fetuin und MPN in Abhängigkeit von der Zeit

3.3. Abspaltung von Acetylneuraminsäure in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

3.4. Bestimmung der Neuraminidaseaktivität einiger Parainfluenza Typ 1 (Sendai) Viren mit den Substraten Fetuin und MPN

3.4.1. Bestimmung der Neuraminidaseaktivität einiger Parainfluenza Typ 1 (Sendai) Viren mit dem Substrat Fetuin

3.4.2. Bestimmung der Neuraminidaseaktivität einiger Parainfluenza Typ 1 (Sendai) Viren mit dem Substrat MPN

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543519_0102

1. Einleitung

Im Jahr 1942 entdeckte Hirst, daß nach der Infektion von Hühnereiern mit Influenza Viren die Allantoisflüssigkeit ein Enzym enthielt, das in der Lage war, Rezeptoren auf der Oberfläche von Erythrocyten zu zerstören und damit die Agglutination der Blutzellen durch Viren zu verhindern (Hirst 1942 a, b). Aus diesem Grund erhielt das Enzym den Namen "Receptor Destroying Enzym", RDE abgekürzt (Burnet und Stone, 1947). Weitere Experimente zeigten, daß dieses Enzym auch imstande war, acetylierte Neuraminsäure, auch Sialinsäure genannt, von verschiedenen Substraten abzuspalten (Gottschalk und Lind, 1949; Kuhn und Brossmer, 1956, 1958). Damit ging man auf den Namen Neuraminidase über (Gottschalk, 1957; Blix, 1957).

Im Bereich der Viren wurde das Enzym Neuraminidase bisher nur in der Gruppe der Myxoviren gefunden (Drzeniek, 1972). Aufgrund von Unterschieden im Durchmesser ihrer Ribonukleoproteine wurden die Myxoviren in Orthomyxoviren und Paramyxoviren unterteilt (Melnick, 1973 a, b). Zu den Orthomyxoviren gehören die Influenza Viren Typ A, B und C; die Untergruppe der Paramyxoviren enthält die Mumpsviren, die RS-Viren (Respiratory syncytial virus), die NDV (Newcastle disease virus) und die Parainfluenza Viren Typ 1, 2 und 3. Zu den Parainfluenza Viren Typ 1 werden auch die Sendai Viren gerechnet.

Das Enzym Neuraminidase befindet sich auf der Oberfläche der Viren und zwar in stachelartigen Fortsätzen (sogenannten spikes). Bei den Orthomyxoviren nimmt man an, daß sie zwei verschiedene Arten von spikes besitzen. Die einen enthalten Neuraminidase, die anderen zeigen hämagglutinierende Eigenschaften (Laver und Valentine, 1969; Schulze, 1972; Webster, 1972). Im Gegensatz dazu hat man festgestellt, daß die Paramyxoviren nicht zwei verschiedene Moleküle für Neuraminidase und Hämagglutinin aufweisen, sondern daß die Neuraminidaseaktivitäten und hämagglutinierenden Eigenschaften von einem einzigen Protein bewirkt werden (Tozawa, 1973; Scheid und Choppin, 1973).

Chemisch gesehen, handelt es sich bei dem Enzym Neuraminidase um ein Glykoprotein (Lazdins, 1972).Bei den Orthomyxoviren besteht es aus vier Untereinheiten, von denen jede ein Molekulargewicht von 60 000 Daltons besitzt. Allerdings weisen die isolierten Untereinheiten keine Neuraminidaseaktivitäten auf.
Für die Neuraminidasen der Paramyxoviren NDV, Sendai und SV 5 wurden Molekulargewichte von 67 000 und 114 000 gefunden (Drzeniek, 1974). Ob bei ihnen die 60 000 Daltons Untereinheiten Neuraminidaseaktivitäten zeigen, ist noch nicht erwiesen (Tozawa, 1973; Maeno, 1970). Es besteht auch keine Einigung darüber, ob die Enzymaktivität nicht erst durch die Bildung von Dimeren oder Tetrameren aus den Untereinheiten zustande kommt (Bucher und Kilbourne, 1972).

Neben den Viren findet man auch bei den Bakterien Vertreter, die das Enzym Neuraminidase bilden. Das wichtigste Bakterium dürfte Vibrio cholerae sein; schon seit mehreren Jahren ist die von ihm gebildete Neuraminidase als standardisiertes Präparat im Handel erhältlich. Diese Neuraminidase weist ein Molekulargewicht von 68 000 Daltons auf (Drzeniek, 1972; Balke, 1974).
Außer bei Viren und Bakterien findet man das Enzym auch bei Mykoplasmen und Protozoen. Auch in höheren Organismen kommt es vor. So zeigt z.B. das menschliche Gehirn in verschiedenen Abschnitten unterschiedliche Neuraminidaseaktivitäten.
Als Substrat für Bakterien- und Virusneuraminidasen können all diejenigen Substanzen dienen, die α - O - ketosidisch gebundene Neuraminsäure enthalten. Weder α - S - , noch α - N - gebundene Neuraminsäuren werden durch Neuraminidasen dieses Ursprungs abgespalten (Khorlin, 1970). Auch die β - Anomeren der Neuraminsäuren werden nicht an ihren Bindungsstellen angegriffen.
Wichtig für das Zustandekommen einer Interaktion zwischen Enzym und Substrat ist das Vorhandensein einer nicht veränderten Carboxylgruppe an der Neuraminsäure (Brossmer, 1974). Dadurch, daß diese Gruppe frei vorliegen muß, er-

geben sich bei hochmolekularen Substanzen isoelektrische Punkte, die im sauren pH - Bereich liegen. Eine besonders hohe Hydrolyserate erhält man bei den Substraten, die das acetylierte Derivat der Neuraminsäure, die N-acetylneuraminsäure (abgekürzt NANS), enthalten. Von Bedeutung ist weiterhin, welche Bindungsart zwischen der Neuraminsäure und seinem Trägermolekül besteht. Handelt es sich bei dem Trägermolekül um ein Kohlenhydrat, dann kann die N-acetylneuraminsäure in einer 2→3, einer 2→6 oder 2→8 - Bindung vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, zwei Neuraminidasen verschiedener Herkunft (nämlich Virusneuraminidase und Bakterienneuraminidase) in ihrem Verhalten einem hochmolekularem Substrat (Fetuin) und einem niedermolekularem Substrat (MPN) gegenüber zu untersuchen.
Für den Nachweis des Reaktionsproduktes einer Enzym - Substrat-Reaktion standen für das Substrat Fetuin ein Testverfahren, für das Substrat MPN teilweise zwei Testverfahren zur Verfügung.
In einem zweiten Teil sollten die Neuraminidaseaktivitäten fünf verschiedener Sendai Viren in Abhängigkeit zum verwendeten Substrat getestet werden. In diesem Abschnitt sollte auch das Hämagglutinationsvermögen der Viren in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1.

Fetuin - Es wurde Fetuin (Spiro Method) von der Firma Grand Island Biological Company USA verwendet. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Konzentration 9,o mg/ml. Als Lösungsmittel wurde "Phosphate Buffered Saline" (PBS) verwendet. Die Lösung wurde portionsweise abgefüllt und bei - 20° C eingefroren.
Gehalt an Acetylneuraminsäure = 8,7 % , MW 48 400

2.1.2.

Perjodat - Reagenz - 0,53 g Natriumperjodat (Firma Merck Nr. 6597) wurden in 100,o ml 0,125 M Schwefelsäure (aus 1,o N H_2SO_4 Firma Merck Nr. 9074) gelöst. Die Lösung wurde alle 8 Tage frisch hergestellt.

2.1.3.

Natriumarsenit - Reagenz - 2,o g Natriumarsenit (Firma Merck Nr. 6287) wurden in 100,o ml 0,5 N Salzsäure (aus 1 N HCl Firma Merck Nr. 9057) gelöst. Die Lösung wurde alle 8 Tage frisch hergestellt.

2.1.4.

Thiobarbitursäure - Reagenz - 7,21 g Thiobarbitursäure (Firma Merck Nr. 8180 o. Firma Serva Nr. 36 108) wurden in demineralisiertem Wasser gelöst, mit Hilfe von Natronlauge auf einen pH - Wert von 9,o eingestellt und auf ein Volumen von 500,o ml mit Wasser aufgefüllt.

2.1.5.

Butanol - Reagenz - 475,o ml Butanol (Firma Merck Nr. 1990) wurden mit 25,o ml Salzsäure 32 % (Firma Merck nr. 319) gemischt.

2.1.6.

Phosphate Buffered Saline (PBS) - Hergestellt nach der Vorschrift von Dulbecco und Vogt (Dulbecco u. Vogt, 1954) mit einem pH - Wert von 7,2.

2.1.7.

Neuraminsäure - Diese Substanz wurde von der Firma Serva, Heidelberg bezogen (Nr. 10 465). Die wässerige Lösung hatte

eine Konzentration von 0,1 mg/ml. Sie wurde für jeden Versuchstag neu hergestellt. MW 309

2.1.8.
Bakterienneuraminidase aus Vibrio cholerae wurde von den Behringwerken, Marburg bezogen. Entgegen der Herstellerangabe besagt eine Vereinbarung der International Union of Biochemistry (Enzyme Nomenclature, 1965), daß eine Enzymeinheit ein µmol Acetylneuraminsäure in einer Minute unter Standardbedingungen freisetzt. Damit entsprechen 500 units/ml der Firmenangabe nur 0,107 units/ml nach IUB - Vereinbarung. Wenn nicht anders angegeben, wurde der Inhalt einer 1,0 ml Ampulle im Verhältnis 1 : 13 mit PBS verdünnt.

2.1.9.
MPN - 2-(3'-methoxyphenyl)-N-acetyl-α-neuraminsäure(MPN) war von der Firma Boehringer Mannheim zur Verfügung gestellt worden. Wenn nicht anders angegeben hatte die Lösung eine Konzentration von 1,036 mg/ml MPN. Lösungsmittel war ein 0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH - Wert von 5,9 .

2.1.10
Methoxyphenol - 3-Methoxyphenol (Firma Merck-Schuchardt Nr. 821232) wurde in einer Konzentration von 4,01 mg/100 ml in Wasser gelöst.

2.1.11.
Natriumcarbonatlösung - Für die 10% Lösung wurde wasserfreies Natriumcarbonat (Firma Merck Nr. 6392) verwendet.

2.1.12
Folin - Reagenz - 2 N Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Firma Merk Nr. 9001)

2.1.13.
Phosphatpuffer - Die Pufferlösung wurde aus 0,5 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung (Substanz Firma Merck Nr. 6580) und Natriumdihydrogenphosphatlösung (Substanz Firma Merck Nr. 6346) hergestellt. 6,0 ml der ersten Lösung wurden mit 44,0 ml der zweiten Lösung gemischt und 1 : 4 verdünnt. Der pH - Wert von 5,9 der 0,1 M Phosphatlösung wurde mit dem pH - Meter nachgemessen.

2.1.14.

Azofarbstofflösung - Verwendet wurde ein diazotiertes p-Nitro-benzolazo-2,5,-dimethoxy-anilin . $ZnCl_2$ von der Firma Serva (Nr. 21 260), das unter dem Namen Fast Black K Salt vertrieben wird. Die stets frisch herzustellende und zu filtrierende Lösung wurde mit einem 0,1 M Phosphatpuffer pH 5,9 in der Konzentration von 6,o mg/ml hergestellt. Der Azofarbstoff wird mit der Abkürzung DS-ADND von der Firma Koch-Light Lab. vertrieben (Sedmark, 1973)

2.1.15.

Erythrocytensuspension - 5,o ml Citratblut der menschlichen Blutgruppe O wurden bei 1500 Upm zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung mit zweimaligem Zentrifugieren bei 1500 Upm wurden die Erythrocyten mit PBS auf 0,4% verdünnt.

2.1.16.

Viren - Die verwendeten Viren gehören alle der Paramyxovirusgruppe an und sind Parainfluenzaviren Typ 1 (Sendai-Viren). Folgende Stämme wurden eingesetzt:

Fushimi, Z, Mn, Obayashi, 6/94 (Lief F. et al 1975)

2.1.17

Die in der Filteranlage verwendeten Filterpapiere wurden von der Firma Sartorius, Göttingen bezogen. SM 11 306, Ø 25 mm, Porengröße 0,45

2.1.18.

Die für die verschiedene Teste gebrauchten Mikrotiterplatten kamen von der Firma Greiner, Nürtingen.

2.1.19.

Alle Extinktionen wurden mit einem Photometer des Typs " Gilford 240 " gemessen.

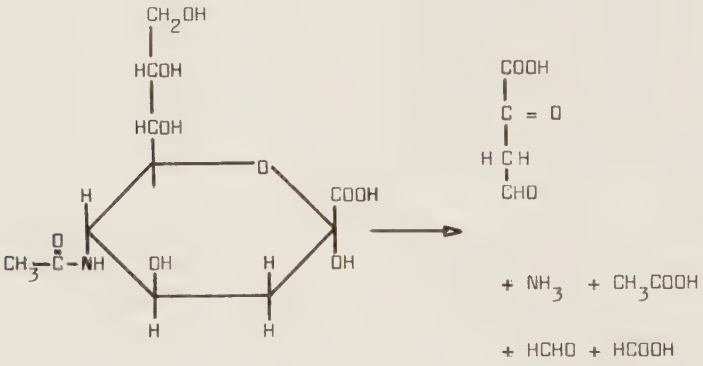
2.2. Methoden

Die genauen Versuchsbedingungen werden in den jeweiligen Abschnitten aufgeführt. Im folgenden werden nur die allgemein verwendeten Methoden ausführlich beschrieben.

2.2.1. Fetuin Test (Prinzip und Auswertung)

Der Test wird in gut gereinigten Zentrifugengläsern durchgeführt. Je nach Testerfordernissen wird in diese Gläser die Bakterien- bzw. Virusneuraminidase oder das Substrat Fetuin vorgelegt. Um in dem endgültigen Testansatz ein einheitliches Gesamtvolumen von 0,5 ml zu erhalten, wird die Differenz zwischen den eingesetzten Volumina des Enzyms und des Substrates und dem angestrebten Gesamtvolumen von 0,5 ml durch PBS ergänzt. Das Enzym-Substrat-Gemisch wird für genau 15 Minuten in einem 37° C Wasserbad inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgt eine Zugabe von 0,3 ml Perjodat-Reagenz (2.1.2.). Der Testansatz verbleibt für weitere 30 Minuten in einem 37° C Wasserbad. Darauf werden jeder Probe 0,2 ml Natriumarsenit - Reagenz (2.1.2.) zugesetzt. Nachdem die entstandene braune Farbe verschwunden ist, was bei Zimmertemperatur nach ca. 5 Minuten der Fall ist, kann 2,0 ml Thiobarbitursäure - Reagenz (2.1.4.) zugegeben werden. Die Öffnung des Röhrchens wird mit einer Glaskugel verschlossen und für 7,5 Minuten in kochendes Wasser gesetzt. Darauf folgt ein 10minütiges Abkühlen im Eisbad. Die anschließende Zugabe von 5,0 ml Butanol - Reagenz (2.1.5.) muß sehr genau erfolgen. Nachdem die Probe mehrmals gründlich geschüttelt worden ist, wird für 5 Minuten bei 3000 Upm und 4° C Temperatur zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren ist eine Phasentrennung eingetreten. Die obere, meist gelblich-rot gefärbte Schicht wird abgehebert und die Extinktion in einer 1 cm Küvette in einem Photometer bei 550 nm gegen Butanol-Reagenz (2.1.5.) als Leerwert bestimmt.
In diesem Test, der in seinen Grundzügen zuerst von Warren (Warren, 1959) beschrieben und dann von Aminoff (Aminoff, 1961) abgeändert wurde, wird von dem als Substrat verwendetem Glykoprotein Fetuin Acetylneuraminsäure abgespalten. Durch die Zugabe von Perjodat wird einerseits die Enzymreaktion

unterbrochen, andererseits die während der Inkubationszeit abgespaltene Neuraminsäure oxidativ gespalten.



Die in Ringform vorliegende Acetylneuraminsäure wird oxidativ in einen C_4 - Körper, das β-Formylpyruvat, und niedermolekulare Anteile gespalten (Weissbach und Hurwitz, 1959). Das überschüssige Perjodat wird durch Zugabe von Natriumarsenit abgefangen. Durch den Kochvorgang entsteht aus dem β-Formylpyruvat und der zugesetzten Thiobarbitursäure eine farbige Verbindung. Die hinzugefügte Butanollösung erhöht nur die Farbintensität.
Keine Veränderung des chemischen Ablaufes tritt ein, wenn man das Produkt der Enzym-Substrat-Reaktion, die Acetylneuraminsäure, direkt in den Test einsetzt.

Da die Testbedingungen in bezug auf Konzentrationen und Volumina etwas verändert wurden gegenüber denen, die in der Literatur angegeben sind, mußte festgestellt werden, ob das Absorptionsmaximum von 549 nm (Aminoff, 1961) für den Fetuin Test auch unter den geänderten Bedingungen zutraf.

In einer Doppelbestimmung wurden pro Ansatz 10 µg Acetylneuraminsäure in den Fetuin Test eingesetzt und der Test wie beschrieben (2.2.1.) durchgeführt. Die Extinktionen der Proben wurden in einem Spektralbereich von 400 - 700 nm

durchgemessen. Aus der graphischen Darstellung ergibt sich ein Maximum bei 550 nm. Alle weiteren Messungen, die für den Fetuin Test notwendig waren, wurden deshalb bei einer Wellenlänge von 550 nm durchgeführt.

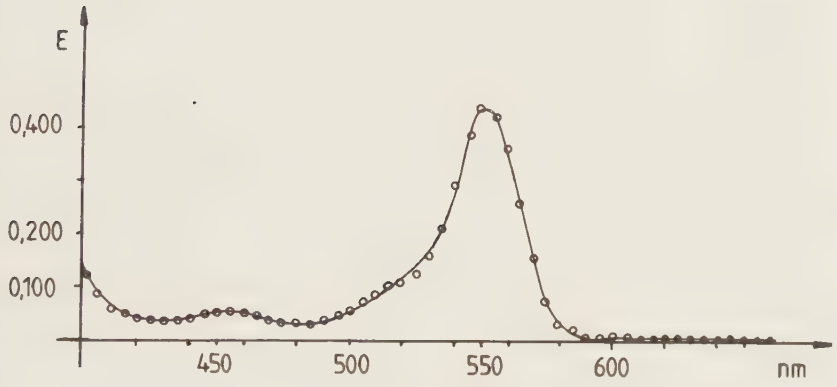


Abbildung 1 Bestimmung des Absorptionsmaximums für den Fetuin Test. 10 µg Acetylneuraminsäure pro 0,5 ml Ansatz

Um von den mit Hilfe des Photometers gemessenen Extinktionen auf den Gehalt an abgespaltener Acetylneuraminsäure umrechnen zu können, muß das Lambert - Beersche - Gesetz angewendet werden:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

(E = Extinktion, ε = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration der Meßlösung, d = Lichtweg in der Küvette)

Dieses Gesetz, das eine Beziehung herstellt zwischen der Konzentration einer Lösung und ihrer Lichtabsorption, hat nur Gültigkeit für verdünnte Lösungen und solche, bei denen eine Linearität zwischen eingesetzten Konzentrationen und Absorption besteht.
Da man sich bei den eingesetzten Lösungen (z.B. Neuraminsäurelösung 2.1.7.) im µmolarem Bereich bewegt, ist damit die erste Bedingung erfüllt.
Das lineare Verhältnis zwischen Absorption (bzw. Extinktion) und Acetylneuraminsäurekonzentration muß nachge-

wiesen werden. Hierzu wurden in den Fetuin Test ansteigende Konzentrationen von Acetylneuraminsäure eingesetzt und die jeweiligen Extinktionen gemessen. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 2.

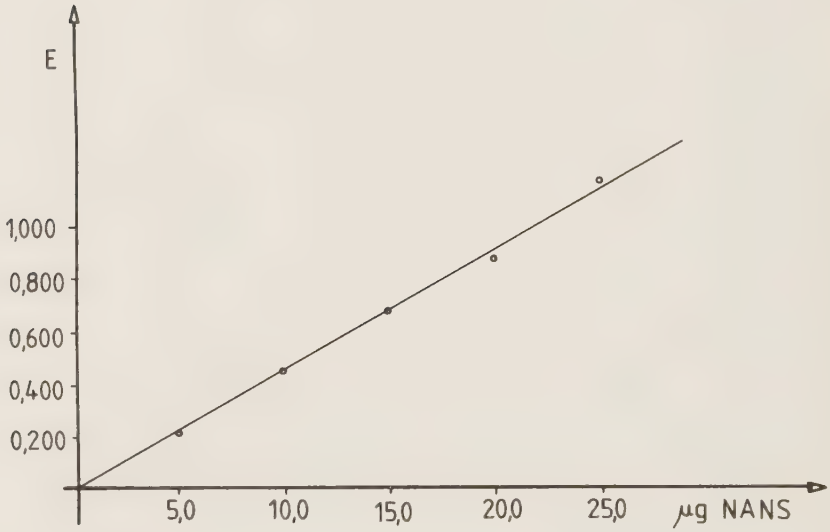


Abbildung 2 Abhängigkeit der Extinktionen von steigenden Acetylneuraminsäuremengen

Da eine Linearität zwischen Acetylneuraminsäurekonzentration und Absorption vorhanden ist, ist es möglich, die in dem Lambert-Beerschen-Gesetz unbekannte Größe, den Extinktionskoeffizienten, zu bestimmen. Nach der Umformung der oben angeführten Gleichung ergibt sich:

$$\varepsilon = \frac{E}{c \cdot d}$$

Wie aus Abbildung 2 ersichtlich erhielt man für eine Konzentration von 10 µg Acetylneuraminsäure pro 0,5 ml Ansatz eine Extinktion von 0,450. Somit ergeben sich für die einzelnen Größen folgende Zahlenwerte:

E = 0,450 d = 1,0 cm

c = 10 µg NANS/5,0 cm^3 (Butanolmenge) = 0,0323 µmol/5,0 cm^3

Somit ergibt sich folgender Quotient:

$$\varepsilon = \frac{0{,}450 \cdot 5{,}0\ cm^3}{0{,}0323\ \mu mol \cdot 1{,}0\ cm} = 69{,}65\ \frac{cm^2}{\mu mol}$$

Der µmolare Extinktionskoeffizient bezieht sich auf 1,0 cm^3 Testansatz. Für den molaren Extinktionskoeffizienten erhält man dann:

$$\varepsilon = 69\,650\ \frac{cm^2}{Mol}$$

Damit weicht der bestimmte Extinktionskoeffizient nur um 1,5% von dem in der Literatur angegebenem ab. Die weiteren Berechnungen wurden mit einem Extinktionskoeffizienten von 70 700 cm^2/Mol durchgeführt(Aminoff, 1961).

Somit ist es nun möglich, ohne Schwierigkeiten die in einem Testansatz befindliche Menge an freier Acetylneuraminsäure zu bestimmen. In den folgenden Berechnungen wurde die Acetylneuraminsäuremenge und die Enzymeinheit durch das Einsetzen der Meßwerte in die angefügten Gleichungen erhalten:

$$\mu mol\ NANS = \frac{Extinktion \cdot 5{,}0}{\mu molarer\ Extinktionskoeffizient}$$

$$\mu g\ NANS = \mu mol\ NANS \cdot 309\ (MW)$$

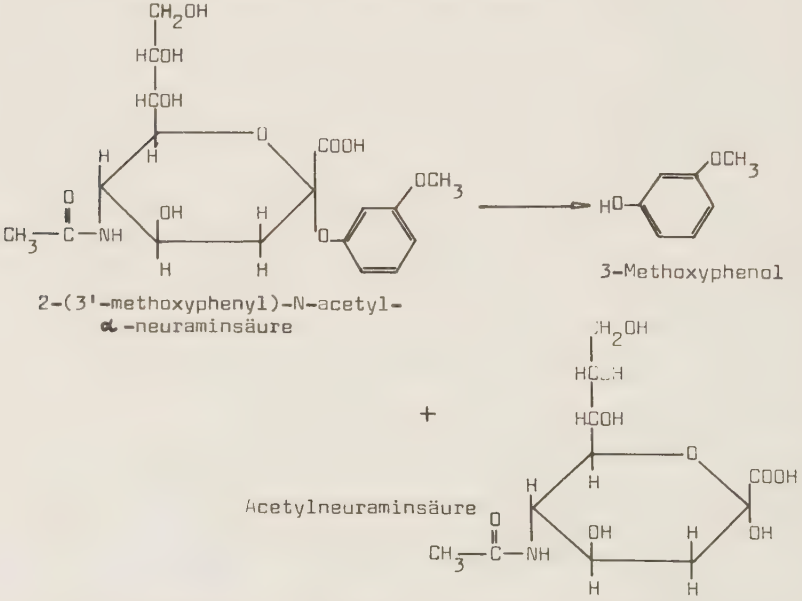
$$units\ NAase = \frac{\mu mol\ NANS}{15\ Minuten}$$

2.2.2. Folin (MPN) Test

Der Test wird in gut gereinigten Zentrifugengläsern durchgeführt. Je nach Testerfordernissen wird in diese Gläser die Bakterien- bzw. die Virusneuraminidase oder das Substrat MPN vorgelegt. Um in dem endgültigen Testansansatz ein einheitliches Gesamtvolumen von 0,5 ml zu erhalten, wird die Differenz, die sich zwischen der Summe der eingesetzten Volumina des Enzyms und des Substrates und dem angestrebten Gesamtvolumen von 0,5 ml ergibt, mit PBS auf-

gefüllt. Das Enzymsubstratgemisch wird für genau 15 Minuten in einem Wasserbad von 37° C inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgt die Zugabe von 1,5 ml Natriumcarbonatlösung (2.1.11.). Anschließend wird der Probe 0,2 ml Folin - Reagenz (2.1.12.) zugesetzt. Nach einer Wartezeit von ca. 20 Minuten hat sich eine blaue Färbung gebildet, deren Extinktion in einer 1 cm Küvette in einem Photometer bei 750 nm gegen PBS als Leerwert gemessen werden kann.

In diesem Test, der zuerst von Palese (Palese, 1973) beschrieben wurde, wird das als Substrat verwendete MPN [2 - (3'-methoxyphenyl)-N-acetyl-α-neuraminsäure] durch das Enzym Neuraminidase in ein Molekül Acetylneuraminsäure und ein Molekül 3-Methoxyphenol gespalten.



Durch die Zugabe der Natriumcarbonatlösung wird die Enzymreaktion unterbrochen. Das abgespaltene 3-Methoxyphenol liefert mit dem Folinreagenz eine Blaufärbung, deren Auswertung quantitativ möglich ist. In diesem Test wird also nicht die durch die Enzym-Substrat-Reaktion entstandene Acetylneuraminsäure nachgewiesen, sondern das durch die Spaltung von MPN freigewordene 3-Methoxyphenol.

Setzt man in den Folin-Test direkt das Produkt 3-Methoxy-

phenol ein, dann ergibt es mit dem Folin - Reagenz ebenfalls eine blaue Färbung. Mit Hilfe der Methoxyphenollösung (2.1.10.) war es somit möglich, die Testbedingungen zu standardisieren. Testreihen, bei denen der Methoxyphenolstandard von der Norm abwich, wurden verworfen. Versuchsweise in den Folin Test eingesetzte Acetylneuraminsäure ergab mit dem Folin - Reagenz keine Farbreaktion.

Da die Testbedingungen gegenüber denen, die in der Literatur angegeben sind, verändert wurden, mußte festgestellt werden, ob das Absorptionsmaximum von 750 nm (Palese, 1973) für den Folin Test auch unter den veränderten Bedingungen zutraf.

In einer Doppelbestimmung wurden pro Ansatz 8,7 µg 3-Methoxyphenol in den Folin Test eingesetzt und der Test wie beschrieben (2.2.2.) durchgeführt. Die Extinktionen wurden in einem Spektralbereich von 360 nm - 800 nm durchgemessen. Aus der graphischen Darstellung (Abb. 3) ergibt sich ein Maximum bei 750 nm. Alle weiteren Messungen, die für den Folin Test notwendig waren, wurden deshalb bei einer Wellenlänge von 750 nm durchgeführt.

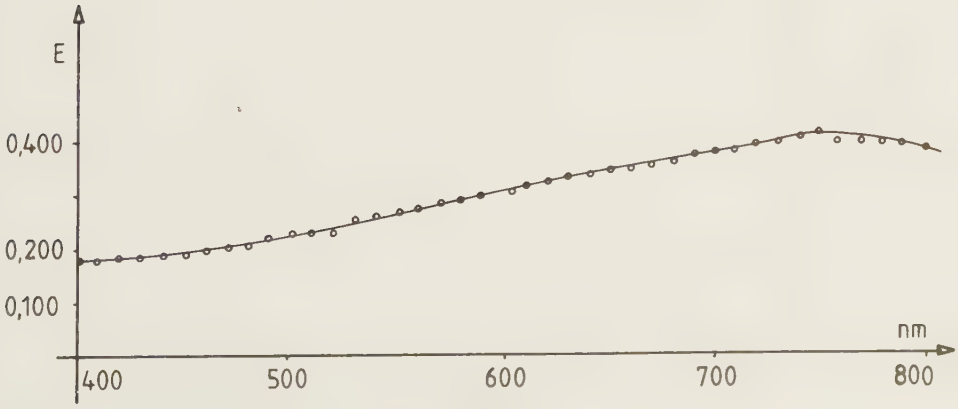


Abbildung 3 Bestimmung des Absorptionsmaximums für den Folin Test. 8,7 µg 3-Methoxyphenol pro 0,5 ml Ansatz

Da im Folin Test das Substrat MPN in gleiche molare Anteile Acetylneuraminsäure und 3-Methoxyphenol aufgespalten wird, ist es möglich von der Konzentration an 3-Methoxyphenol auf die Konzentration an Acetylneuraminsäure zu schließen. Die molare (bzw. µmolare) Konzentration von beiden Stoffen muß im Testansatz gleich sein. So ist es möglich, mit Hilfe der gemessenen Extinktionen den Gehalt an abgespaltener Acetylneuraminsäure zu bestimmen, wenn man, wie schon im Fetuin Test, das Lambert - Beersche-Gesetz anwendet:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

(E = Extinktion, ε = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration der Meßlösung, d = Lichtweg in der Küvette)

Damit dieses Gesetz für den Folin Test und damit für seine gemessenen Extinktionen Gültigkeit hat, muß nachgewiesen werden, daß zwischen der Absorption (bzw. Extinktion) und der 3-Methoxyphenolkonzentration eine Linearität besteht.

Hierzu wurden in den Folin Test ansteigende Konzentrationen von 3-Methoxyphenol eingesetzt und die jeweiligen Extinktionen gemessen. Die eingesetzten Konzentrationen wurden so gewählt, daß sich folgendes Verhältnis ergab:

4,01 µg Methoxyphenol ≙ 10 µg Acetylneuraminsäure

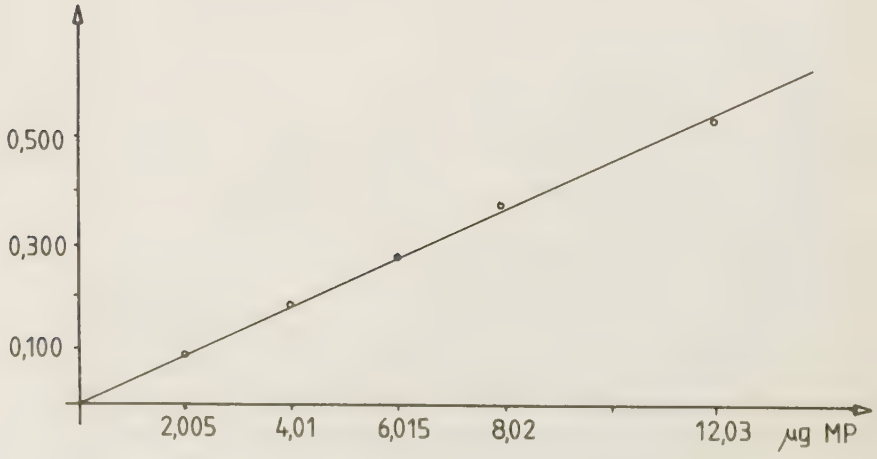


Abbildung 4 Abhängigkeit der Extinktionen von steigenden 3-Methoxyphenolmengen

Da eine Linearität zwischen 3-Methoxyphenolkonzentration (bzw. Acetylneuraminsäurekonzentration) und Absorption vorhanden ist, ist es möglich, die in dem Lambert -Beerschen - Gesetz unbekannte Größe, den Extinktionskoeffizienten zu bestimmen.
Bei einer Konzentration von 0,0323 µmol Methoxyphenol pro 0,5 ml Ansatz (0,0323 µmol MP ≙ 4,01 µg MP ≙ 10 µg NANS) erhielt man eine Extinktion von 0,190. Somit ergeben sich für die einzelnen Größen des Lambert - Beerschen - Gesetzes folgende Zahlenwerte:

E = 0,190 d = 1 cm

c = 0,0323 µmol MP / 2,2 cm^3 (Gesamtflüssigkeitsmenge im Teströhrchen)

Somit ergibt sich folgender Quotient:

$$\varepsilon = \frac{E}{c \cdot d} = \frac{0{,}190 \cdot 2{,}2\ cm^3}{0{,}0323\ \mu mol \cdot 1{,}0\ cm} = 12{,}94\ \frac{cm^2}{\mu mol}$$

In einer zweiten Bestimmung ergab sich für eine höhere Konzentration von 0,0646 µmol Methoxyphenol eine Extinktion von 0,376.

$$\varepsilon = \frac{0{,}376 \cdot 2{,}2\ cm^3}{0{,}0646\ \mu mol \cdot 1{,}0\ cm} = 12{,}80\ \frac{cm^2}{\mu mol}$$

Hieraus ergibt sich ein mittlerer Extinktionskoeffizient von :

$$\varepsilon = 12{,}87\ \frac{cm^2}{\mu mol}$$

Der µmolare Extinktionskoeffizient bezieht sich auf 1,0 cm^3 Testansatz. Für den molaren Extinktionskoeffizienten erhält man dann:

$$\varepsilon = 12\ 870\ \frac{cm^2}{Mol}$$

Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ist es nun möglich bei vorgegebener Extinktion, die Konzentration von 3-Methoxyphenol (bzw. Acetylneuraminsäure) zu bestimmen. In den folgenden Berechnungen wurde die Acetylneuraminsäuremenge und die Enzymeinheit durch das Einsetzen der

Meßwerte in die angefügten Gleichungen erhalten:

$$\mu\text{mol MP} = \mu\text{mol NANS} = \frac{\text{Extinktion} \cdot 2{,}2\ \text{cm}^3}{\mu\text{molarer Extinktionsk.}}$$

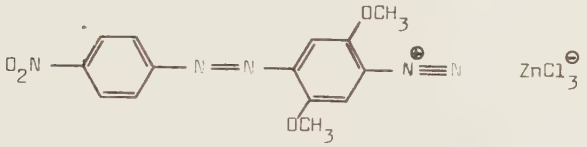
$$\mu\text{g NANS} = \mu\text{mol NANS} \cdot 309 \text{ (MW)}$$

$$\text{units NAase} = \frac{\mu\text{mol NANS}}{15 \text{ Minuten}}$$

2.2.3. Präzipitat (MPN) Test (Prinzip und Auswertung)

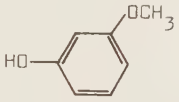
Der Test wird in gut gereinigten Zentrifugengläsern durchgeführt. Je nach Testerfordernissen wird in die Gläser die Bakterien- bzw. die Virusneuraminidase oder das Substrat MPN vorgelegt. Um in dem endgültigen Testansatz ein einheitliches Volumen von 0,5 ml zu erhalten, wird die Differenz, die sich zwischen der Summe der eingesetzten Volumina des Enzyms und des Substrates und dem angestrebten Gesamtvolumen von 0,5 ml ergibt, mit PBS aufgefüllt. Das Enzym-Substratgemisch wird für genau 15 Minuten in einem Wasserbad von 37° C inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Probe in ein Eisbad überführt und nach dem Abkühlen mit 0,2 ml der Azofarbstofflösung (2.1.14.) versetzt. Hierauf folgt eine 30minütige Wartezeit. Als nächster Schritt wird die Probe für 5 Minuten bei 3000 Upm und + 4° C zentrifugiert. Der Inhalt des Zentrifugenglases wird in eine Filteranlage überführt, die mit Sartorius Membranfiltern (2.1.17.) bestückt ist. Die Flüssigkeit wird abgesaugt und das Filterpapier mehrmals mit PBS nachgewaschen. Nachdem das Filterpapier sichtbar trockengesaugt ist, wird es in ein Zentrifugenglas überführt, das eine genau abgemessene Menge von 4,0 ml 0,5 N Natronlauge enthält. Nach mehrmaligem Schütteln und einer Wartezeit von 30 Minuten hat sich eine rötlich - braune Farbe gebildet, deren Extinktion bei 580 nm gegen 0,5 N Natronlauge als Leerwert in einer 1 cm Küvette bestimmt wird.
In diesem Test, der von Sedmak (Sedmak, 1973) beschrieben wurde, wird das als Substrat verwendete MPN [2-(3‡ methoxyphenol) - N - α - neuraminsäure] durch das Enzym

Neuraminidase in ein Molekül Acetylenuraminsäure und ein Molekül 3'Methoxyphenol gespalten (Formeln siehe Folin Test 2.2.2.). Die Enzymreaktion wird durch das Überführen der Probe in ein Eisbad abgestoppt. Durch die Zugabe der Diazoniumsalzlösung (2.1.14.) bildet sich aus dem während der Enzymreaktion abgespaltenem 3-Methoxyphenol und dem Diazoniumsalz eine schwerlösliche Farbverbindung.
In diesem Test wird also nicht primär die Acetylneuraminsäure nachgewiesen, sondern 3-Methoxyphenol

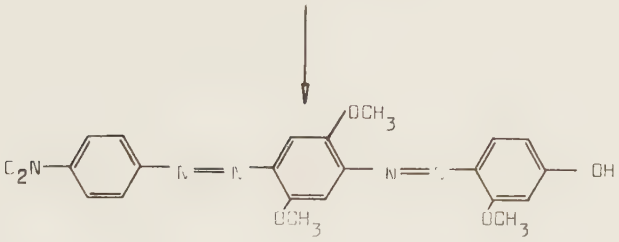


(P-Nitro-benzolazo-2,5,-dimethoxy-anilin • $ZnCl_3$)

+



(3-Methoxyphenol)



Schon an dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, daß große Schwierigkeiten bestanden, das gebildete Präzipitat vollständig in Lösung zu bringen. Sedmak gab zu dem gesamten Ansatz im Zentrifugenglas 4,o ml 0,5 N NaOH und erreichte damit, daß sich das Präzipitat vollständig löste. In dem vorliegenden Versuch gelang dies nicht. Aus diesem Grund wurde das gebildete Präzipitat abfiltriert und dann in 4,o ml 0,5 N NaOH gelöst. Nach diesem

Vorgehen löste sich das Präzipitat vollständig.
Setzt man in den Präzipitat Test direkt das Produkt 3-Methoxyphenol ein, dann entsteht nach Zugabe der Diazoniumsalzlösung ebenfalls eine rötliche Färbung. Mit Hilfe der Methoxyphenollösung (2.1.10.) war es somit möglich, die Testbedingungen zu standardisieren. Testreihen, bei denen der Methoxyphenolstandard nicht den vorgegebenen Wert erreichte, wurden verworfen.
Versuchsweise in den Präzipitat Test eingesetzte Acetylneuraminsäure ergab mit dem Diazoniumsalz keine Farbreaktion. Die in einem Blindversuch eingesetzte Kombination von MPN und Diazoniumsalz ergab eine meßbare Extinktion, die je nach MPN-Konzentration in den jeweiligen Versuchen als "background" berücksichtigt wurde.
Da die Testbedingungen gegenüber denen, die in der Literatur angegeben sind, verändert wurden, mußte festgestellt werden, ob das Absorptionsmaximum von 580 nm (Sedmak, 1973) für den Präzipitat Test auch unter diesen veränderten Bedingungen zutraf.
In einer Doppelbestimmung wurden pro Ansatz 4,96 µg 3-Methoxyphenol in den Präzipitat Test eingesetzt und der Test wie beschrieben (2.2.3.) durchgeführt. Die Extinktionen wurden in einem Spektralbereich von 360 - 800 nm durchgemessen. Aus der graphischen Darstellung ergibt sich ein Maximum bei 580 nm. Alle weiteren Messungen, die für den Präzipitat Test notwendig waren, wurden deshalb bei einer Wellenlänge von 580 nm durchgeführt.

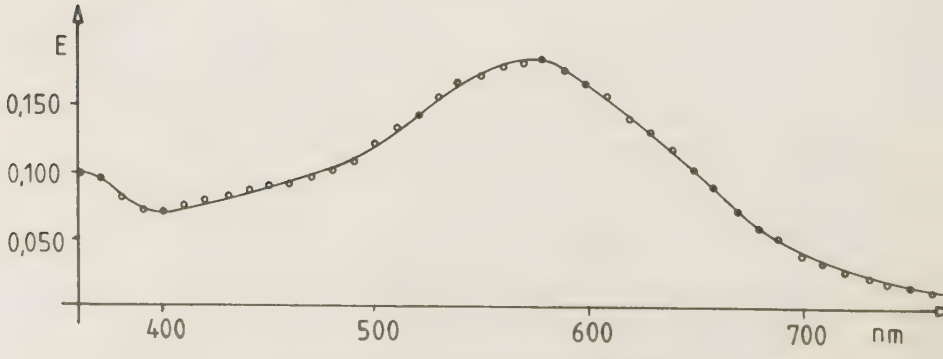


Abbildung 5 Bestimmung des Absorptionsmaximums für den Präzipitat Test. 4,96 µg 3-Methoxyphenol pro 0,5 ml Ansatz

Da im Präzipitat Test das Substrat MPN in gleiche molare Anteile Acetylneuraminsäure und 3-Methoxyphenol aufgespalten wird, muß der Testansatz gleiche molare (bzw. µmolare) Konzentrationen von Acetylneuraminsäure und 3-Methoxyphenol aufweisen. So ist es möglich, mit Hilfe der gemessenen Extinktionen den Gehalt an abgespaltener Acetylneuraminsäure zu bestimmen, wenn man, wie schon beim Folin Test, das Lambert - Beersche - Gesetz anwendet.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

(E = Extinktion, ε = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration der Meßlösung, d = Lichtweg in der Küvette)

Auch für den Präzipitat Test muß nachgewiesen werden, daß zwischen der Absorption und der 3-Methoxyphenolkonzentration ein lineares Verhältnis besteht.
Hierzu wurden in den Präzipitat Test ansteigende Konzentrationen von 3-Methoxyphenol eingesetzt und die jeweiligen Extinktionen gemessen. Die eingesetzten Konzentrationen wurden so gewählt, daß sich folgendes Verhältnis ergab:

4,01 µg Methoxyphenol ≙ 10 µg Acetylneuraminsäure

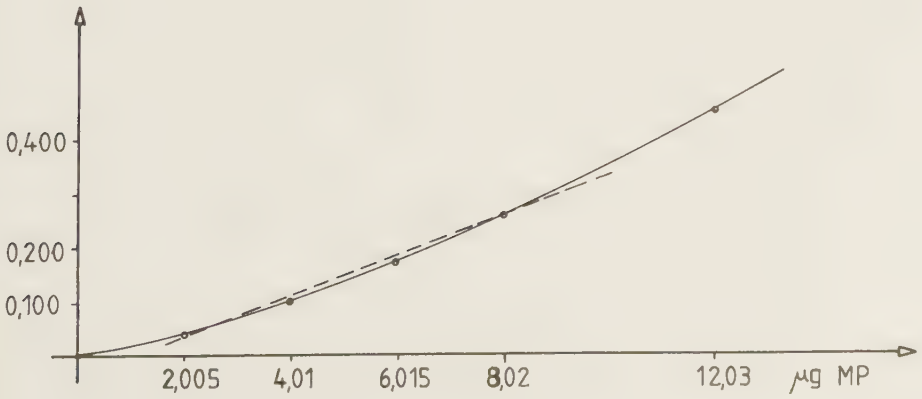


Abbildung 6 Abhängigkeit der Extinktionen von steigenden 3-Methoxyphenolmengen im Präzipitat Test

Im Präzipitat Test ist kein lineares Verhältnis zwischen 3-Methoxyphenolkonzentration (Bzw. Acetylneuraminsäurekonzentration) und Absorption vorhanden. Um dennoch die in den folgenden Testen gemessenen Extinktionen größenordnungsmäßig auswerten zu können, wurde im gebräuchlichem 3-Methoxyphenol-Konzentrationsbereich die Tangente an die Kurve gelegt. Die Steigung der Tandenten ergab sich aus dem Quotienten $\Delta E / \Delta$Methoxyphenolkonz. . Es ergab sich folgender Wert:

$$Q = \frac{E}{c} = \frac{0{,}231}{0{,}0485} = 4{,}762 \frac{cm^3}{\mu mol}$$

Setzt man diesen Wert in das Lambert - Beersche - Gesetz ein, dann ergibt sich:

$$\varepsilon = \frac{E}{c} \cdot \frac{1}{d} = 4{,}762 \frac{cm^3}{\mu mol} \cdot \frac{4{,}0 \text{ (Gesamtvol.)}}{1{,}0 \text{ cm}}$$

$$\varepsilon = 19{,}05 \frac{cm^2}{\mu mol} = 19\,050 \frac{cm^2}{Mol}$$

Der errechnete Extinktionswert ist nur eine grobe Näherung, da zwischen Absorption und Substratkonzentration beim Präzipitat Test keine Linearität besteht. Aus diesem Grund wird das Lambert - Beersche Gesetz nicht erfüllt. Der angeführte Extinktionskoeffizient kann nur mit Einschränkung auf einen Konzentrationsbereich von 5,0 µg bis 20 µg abgespaltener Acetylneuraminsäure angewendet werden.

Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ist es nun möglich, die gemessenen Extinktionen in µmol NANS und µg NANS umzurechnen.

$$\mu mol \text{ MP} = \mu mol \text{ NANS} = \frac{\text{Extinktion} \cdot 4{,}0 \text{ cm}^3}{\mu \text{molarer Extinktionskoeff.}}$$

$$\mu g \text{ NANS} = \mu mol \text{ NANS} \cdot 309 \text{ (MW)}$$

2.2.4. Hämagglutinationstest

Der Test wird auf Mikrotestplatten (2.1.18.) mit Spitzboden durchgeführt. Für jede Testreihe werden 10 Vertiefungen auf der Testplatte benötigt. Um bessere Vergl ichsmöglichkeiten zu haben, wird jede Testreihe dreifach angesetzt.

In die erste Vertiefung einer Reihe werden 0,o5 ml einer unverdünnten Viruslösung gegeben. In die zweite bis zehnte Vertiefung werden mit Hilfe einer Tropfpipette (Dispo-Pipette Firma Flow) jeweils 0,o5 ml PBS - Lösung vorgelegt. Dann wird mit einem Mikroverdünner, der nach dem Abflammen abgekühlt war, 0,o5 ml PBS - Lösung aufgenommen. Der gefüllte Besen des Mikroverdünners wird in die erste Vertiefung der Mikrotestplatte getaucht und durch Quirlen erfolgt die Mischung und damit eine Verdünnung. Der mit der Verdünnung gefüllte Besen des Mikroverdünners wird in die nächste Vertiefung getaucht und durch Quirlen eine Verdünnung zwischen der virushaltigen Lösung des Mikroverdünners und der in dieser Vertiefung vorgelegten PBS - Lösung erreicht. Dieser Vorgang wird bis zur zehnten Vertiefung der Mikrotestplatte fortgeführt. Anschließend wird mit einer 0,o5 ml - Tropfpipette in jede Vertiefung ein Tropfen einer 0,4% Erythrocytensuspension (2.1.15.) gegeben. Die Platte wird geschüttelt und bei + 4^{0} C für zwei Stunden im Kühlschrank gelagert. Nach dieser Zeit wird auf der Platte diejenige Vertiefung bestimmt, bei der der Inhalt noch eine gleichmäßig rote Farbe aufweist und in der Spitze der Vertiefung noch kein roter "Knopf" entstanden ist.

Der Test beruht auf der Eigenschaft von verschiedenen Virusgruppen, Erythrocyten verschiedener Species zu agglutinieren (zu vernetzen). Auch die Paramayxoviren sind in der Lage z.B. Erythrocyten des Menschen zu agglutinieren.

Auf der Mikrotestplatte wurde nach dem oben angegebenem Verfahren eine Verdünnungsreihe hergestellt, die mit 1/2 beginnt und in der zehnten Vertiefung mit 1/1024 aufhört.

Dieser Verdünnungsreihe wurde nun eine jeweils gleiche Menge einer Erythrocytensuspension zugesetzt. Als Hämagglutinations-

titer (abgekürzt HA - Titer) gilt der reziproke Wert derjenigen Verdünnungsstufe, bei der die Erythrocyten noch gerade vollständig agglutiniert sind.

z.B. Verdünnungsstufe 1/64 $\triangleq$ HA - Titer 64

3. Ergebnisse

3.1. Enzymaktivität in Abhängigkeit von Menge an Bakterien- und Virusneuraminidase

Es sollte untersucht werden, in welcher Art die Abspaltung von Acetylneuraminsäure aus den Substraten Fetuin und MPN von der Enzymmenge an Neuraminidase abhängig ist.

Da in diesen Versuchen die Konzentration des Enzyms die Variable sein sollte, mußte für die Substratkonzentration ein einheitlicher Wert gewählt werden. Da sich die Molekulargewichte von Fetuin und MPN um das 150fache unterscheiden, erschien es nicht ratsam, von gleichen Substratkonzentrationen auszugehen. Außerdem werden in den Fetuin-, Folin- und Präzipitat-Testen die Konzentrationen der Produkte nachgewiesen und damit keine Aussagen über die verbleibenden Mengen an Substrat gemacht. Aufgrund dieser Überlegunggen wurden die Substratkonzentrationen so gewählt, daß die eingesetzten Fetuin- und MPN-Mengen einen gleich großen Anteil an abspaltbarer Neuraminsäure enthielten. Aus Vorversuchen hatte sich eine Fetuinkonzentration von 0,9mg/0,5 ml Ansatz als günstig erwiesen. Da Fetuin ein Molekulargewicht von 48 400 hat und einen Gehalt von 8,7% Neuraminsäure (Spiro, 1960) aufweist, enthält ein Mol Fetuin 13,62 Mol gebundene Neuraminsäure. Dieser Anteil an Neuraminsäure ist näherungsweise gleich dem an Acetylneuraminsäure zu setzen.
Somit sind bei einer Fetuinkonzentration von 0,9 mg/0,5 ml Ansatz $2{,}45 \cdot 10^{-4}$ mmol entsprechend 75,7 µg Acetylneuraminsäure enthalten. Die Literkonzentration an Fetuin beträgt dann: $3{,}6 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter
Die MPN-Konzentration mußte so gewählt werden, daß die Lösung einen Anteil von 75,7 µg Acetylneuraminsäure aufwies. Dieser Gehalt ergibt sich, wenn man 0,1036 mg MPN pro 0,5 ml Ansatz einsetzt. Die Literkonzentration an MPN beträgt dann: $4{,}9 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter
Als Virusneuraminidase wurde der Virusstamm Z (2.1.16.) unverdünnt eingesetzt.

Durch Zugabe ansteigender Millilitermengen an Viruslösung konnte die Enzymmenge linear gesteigert werden.
Die Bakterienneuraminidase (2.1.8.) wurde in einem solchen Maß verdünnt, daß 0,1 ml dieser Enzymlösung aus einem Ansatz mit 0,9 mg Fetuin/0,5 ml ca. 5,0 µg Acetylneuraminsäure abspaltete. Daher ergab sich für eine 1,0 ml handelsmäßiger Ampulle Bakterienneuraminidase ein Verdünnungsgrad von 1 : 13.
Damit entsprach die Aktivität, die 0,1 ml Bakterienneuraminidase zeigte, derjenigen, die eine entsprechende Menge Viruslösung hatte.
Bei allen Testen liefen Kontrollen mit. Als wichtigste Kontrolle erwies sich der Einsatz von genau bestimmten Mengen an Neuraminsäure (2.1.7.) und 3-Methoxyphenol (2.1.10.). Erst wenn die Extinktionen dieser Ansätze den Standardwerten entsprachen, wurden die zugehörigen Testreihen ausgewertet. Als weitere Kontrollen wurden in Blindversuchen die Leerwerte der Substrate Fetuin und MPN bestimmt. Dasselbe geschah für die Bakterien- und Virusneuraminidasen. Da sich die Leerwerte der Substrate als wesentlich höher erwiesen, als diejenigen der Enzyme, wurde von allen Meßwerten die in den Blindversuchen bestimmten Extinktionen der Substrate als "background" abgezogen.
Die Teste wurden wie in 2.2.1., 2.2.2. und 2.2.3. beschrieben in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt. Von den erhaltenen beiden Extinktionen wurde das arithmetische Mittel bestimmt.
Die erhaltenen Meßergebnisse sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen.
Wie aus Abbildung 7 zu ersehen ist, erbrachten die Enzym-Substrat-Kombinationen MPN(Folin)/ Virusenzym, MPN(Präzipitat)/Virusenzym und Fetuin/Bakterienenzym sehr große Mengen an abgespaltener Acetylneuraminsäure. Außerdem lagen die Meßergebnisse bei diesen drei Kombinationen eng beieinander. Eine direkte Proportionalität zwischen Enzymmenge und abgespaltener Acetylneuraminsäure ist vorhanden.
Die Enzym-Substrat-Kombinationen MPN(Folin)/Bakterienenzym und MPN(Präzipitat)/Bakterienenzym zeigen erheblich nie-

ml Enzym	Fetuin/Virus			MPN(Folin)/Virus			MPN(Präzip.)/Virus		
	E	µmol	µg	E	µmol	µg	E	µmol	µg
0,05	0,118	0,0083	2,56	0,069	0,0117	3,61	0,031	0,0065	2,00
0,1	0,194	0,0137	4,23	0,126	0,0215	6,64	0,083	0,0174	5,37
0,15	0,250	0,0176	5,43	0,184	0,0314	9,70	0,125	0,0262	8,09
0,2	0,300	0,0212	6,55	0,237	0,0405	12,51	0,181	0,0379	11,71
0,25	0,334	0,0236	7,29	0,292	0,0499	15,41	0,240	0,0503	15,54
0,3	0,351	0,0248	7,66	0,329	0,0562	17,36	0,295	0,0619	19,12
0,35	0,364	0,0257	7,94	0,383	0,0654	20,20	0,348	0,0730	22,55
0,4	0,368	0,0260	8,03	0,413	0,0705	21,78	0,375	0,0787	24,31

Tabelle 1 Die angegebenen µmol und µg Werte beziehen sich auf 0,5 ml Ansatz und 15 Minuten Inkubationszeit

ml Enzym	Fetuin/Bakter.			MPN(Folin)/Bak.			MPN(Präzip.)/Bak.		
	E	µmol	µg	E	µmol	µg	E	µmol	µg
0,05	0,124	0,0087	2,69	0,012	0,0020	0,62	0,010	0,0020	0,61
0,1	0,297	0,0209	6,46	0,034	0,0058	1,79	0,011	0,0023	0,71
0,15	0,370	0,0261	8,06	0,055	0,0093	2,87	0,022	0,0046	1,42
0,2	0,585	0,0413	12,76	0,067	0,0114	3,52	0,033	0,0069	2,13
0,25	0,738	0,0521	16,09	0,083	0,0141	4,35	0,042	0,0088	2,71
0,3	0,802	0,0567	17,52	0,109	0,0186	5,74	0,054	0,0113	3,49
0,35	0,958	0,0677	20,91	0,126	0,0215	6,64	0,083	0,0174	5,37
0,4	1,082	0,0764	23,60	0,128	0,0218	6,73	0,089	0,0186	5,74

Tabelle 2 Die angegebenen µmol und µg Werte beziehen sich auf 0,5 ml Ansatz und 15 Minuten Inkubationszeit

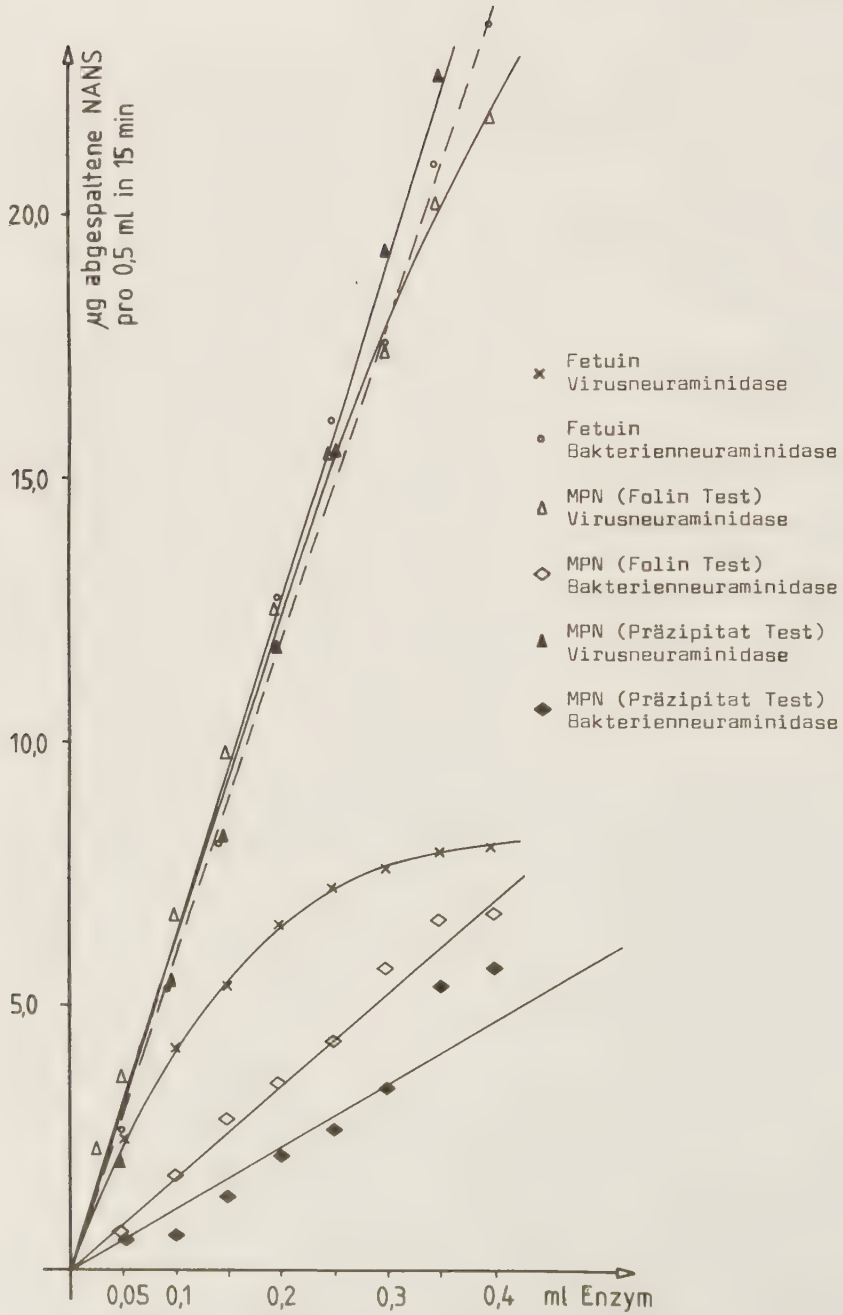


Abbildung 7 Abhängigkeit der Abspaltung von Acetylneuraminsäure von der Konzentration an Bakterien- und Virusneuraminidase
75,7 µg abspaltbare Acetylneuraminsäure pro 0,5 ml Ansatz

drigere Mengen an abgespaltener Acetylneuraminsäure. Aber auch bei diesen Kombinationen ist eine Proportionalität gegeben.
Eine Sonderstellung nimmt die Kombination Fetuin/Virusenzym ein. Hierbei ergab sich eine Kurve, die bei ansteigenden Virusmengen die Form einer Sättigungs- oder Hemmkurve zeigte.
Es ist also festzustellen, daß das niedermolekulare Substrat MPN mit dem Virusenzym die höchsten Mengen an abgespaltener Acetylneuraminsäure erbrachte. Im Gegensatz dazu erfolgte nur eine minimale Enzymreaktion zwischen Bakterienneuraminidase und dem Substrat MPN.
Die Enzymmengen, die in diesem Versuch eingesetzt wurden, waren in Ihrer Aktivität so eingestellt worden, daß gleiche Mengen an Virus- bzw. Bakterienneuraminidase einen bestimmten Betrag an Acetylneuraminsäure aus dem Substrat Fetuin freisetzten. Dieser selbstgewählte Standard war der Ausgangswert für diese Versuchsreihe.
Für die weiteren Versuchsreihen, bei denen eine Konstante Enzymmenge eingesetzt werden sollte, wurde der Wert 0,1 ml Virus- bzw. Bakterienenzym gewählt, da bei dieser Menge die in Abbildung 7 dargestellten Kurven in einem linearen Bereich lagen.

3.2. Abspaltung von Acetylneuraminsäure aus den Substraten Fetuin und MPN in Abhängigkeit von der Zeit

Aus versuchstechnischen Gründen war in den bisherigen Versuchsreihen eine Reaktionszeit von 15 Minuten gewählt worden. Um Fehlerquellen auszuschließen, soll in diesem Abschnitt untersucht werden, ob eine definierte Enzymmenge, die pro Zeiteinheit eine bestimmte Substratmenge spaltet, bei der gewählten Reaktionszeit die erwartete Kinetik auch einhält. In dieser Versuchsanordnung sollte die Zeit die Variable sein, also mußte eine feste Substratkonzentration und Enzymkonzentration gewählt werden. Die Substratmenge wurde wieder so gewählt, daß die Lösung einen Gehalt von 75,7 µg

abspaltbarer Acetylneuraminsäure hatte.
Bei der Wahl einer sinnvollen Enzymkonzentration bestand die Schwierigkeit, einen Bezugswert zu finden. Im Abschnitt 3.1. waren Enzymmengen eingesetzt worden, die eine definierte Menge Acetylneuraminsäure aus Fetuin freisetzten. In dieser Versuchsreihe sollte aber das Verhältnis Enzymaktivität zur Substratkonzentration in einem definiertem Verhältnis stehen. Darum wurde auf die internationale Definition einer Enzymeinheit zurückgegriffen, die wie folgt lautet:

Eine Einheit (U) entspricht der Enzymaktivität, welche die Umwandlung von 1 Mikromol Substrat pro Minute unter genau festgelegten Versuchsbedingungen katalysiert.

Darum wurden aus der Tabelle 1 und 2 die Meßwerte für 0,1 ml Enzym entnommen und die für diese Enzymmenge bei dem jeweiligen Substrat erreichte Enzymaktivität errechnet. Aufgrund der errechneten Enzymaktivitäten wurde für diese Versuchsreihe eine Enzymaktivität von $1{,}2 \cdot 10^{-3}$ U festgesetzt. Welcher Enzymmenge in ml das entspricht zeigt die Tabelle 4.

	Enzymmenge in ml aus Tab. 1 + 2	errechnete Units	errechnete Units	einzusetz. Enzymmenge in ml
Fetuin Virus	0,1	$0{,}91 \cdot 10^{-3}$	$1{,}2 \cdot 10^{-3}$	0,130
Fetuin Bakter.	0,1	$1{,}39 \cdot 10^{-3}$	$1{,}2 \cdot 10^{-3}$	0,086
MPN(Folin) Virus	0,1	$1{,}43 \cdot 10^{-3}$	$1{,}2 \cdot 10^{-3}$	0,084
MPN(Folin) Bakter.	0,1	$0{,}38 \cdot 10^{-3}$	$1{,}2 \cdot 10^{-3}$	0,310

Tabelle 4 Berechnung der Enzymmengen, um einheitliche Enzymaktivitäten zu erreichen

Die Teste wurden wie in 2.2.1. und 2.2.2. beschrieben durchgeführt. Der Präzipitat Test wurde nicht mit einbezogen, da es nicht möglich gewesen wäre, nach dem in der Tabelle 4

dargestelltem Verfahren, die erforderlichen Enzymeinheiten im Präzipitat Test mit Bakterienneuraminidase zu erreichen, ohne die in 2.2.3. beschriebenen Testbedingungen zu ändern.

Auch in diesen Testen liefen Kontrollen mit. Es wurden die Neuraminsäurelösung (2.1.7.) und die 3-Methoxyphenollösung (2.1.10.) in die Teste eingesetzt. Ergaben sich die Standardwerte aus diesen Proben, wurden die zugehörigen Testreihen ausgewertet. Als weitere Kontrollen liefen in Blindversuchen die Substrate Fetuin und MPN, sowie die Enzyme Bakterien- und Virusneuraminidase mit. Da die Leerwerte der Substrate im Verhältnis zu den Enzymen die höheren Meßwerte ergaben, wurden sie von den Extinktionen der Testreihen als "background" abgezogen. Die Testreihen wurden in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt. Von den erhaltenen beiden Extinktionen wurde das arithmetische Mittel bestimmt. Die Berechnung der µg abgespaltener Acetylneuraminsäure wurde, wie in den Testbeschreibungen aufgeführt, vorgenommen.

Reaktionszeit (min)	1	5	10	15	20	30	60
Fetuin Virus (in µg)	2,02	3,85	4,77	6,10	6,60	8,85	13,10
Fetuin Bakter. (in µg)	--	1,02	3,92	5,59	6,82	9,14	15,02
MPN (F) Virus (in µg)	--	1,07	3,90	5,78	6,81	9,31	11,76
MPN (F) Bakter. (in µg)	--	1,30	2,66	5,35	7,61	7,87	14,85

Tabelle 5 Die angegebenen µg Werte beziehen sich auf die in 0,5 ml Ansatz abgespaltene Acetylneuraminsäure

Wie aus der graphischen Darstellung 8 zu ersehen ist, weisen der Fetuin Test mit Bakterienneuraminidase und der

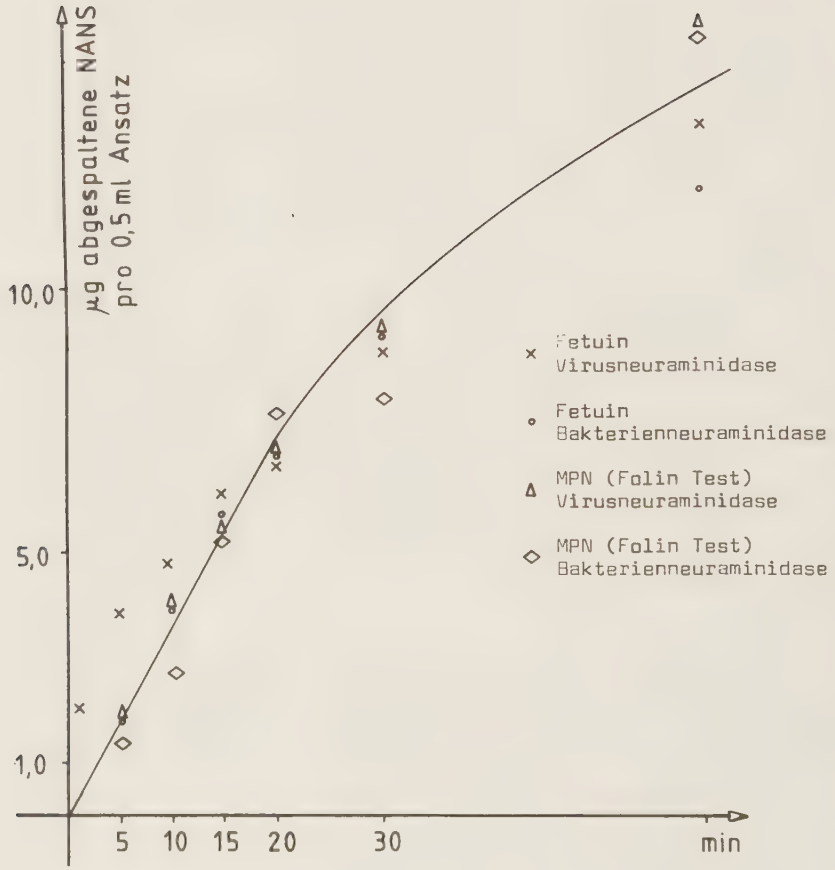


Abbildung 8 Abspaltung von Acetylneuraminsäure in Abhängigkeit von der Zeit
$1{,}2 \cdot 10^{-3}$ Enzymeinheiten bezogen auf das jeweilige Substrat
Substratkonzentration 75,7 µg abspaltbarer Acetylneuraminsäure pro 0,5 ml Ansatz

MPN (Folin) Test mit Bakterien- sowie Virusenzym dieselbe Kinetik auf. Lediglich der Fetuin Test mit Virusneuraminidase zeigt in den ersten 10 Minuten eine größere Reaktionsgeschwindigkeit.

Somit sind bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten die

beim Fetuin Test mit Bakterienneuraminidase und die beim MPN (Folin) Test mit Bakterien- sowie Virusneuraminidase in diesem Zeitintervall gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten annähernd gleich der Anfangsgeschwindigkeit.
Beim Fetuin Test mit Virusneuraminidase ist die Reaktionsgeschwindigkeit in den ersten 5 Minuten ungefähr doppelt so groß, wie die in den drei übrigen Testen.

3.3. Abspaltung von Acetylneuraminsäure in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Um über die Affinität von Virus- bzw. Bakterienneuraminidase zu den Substraten Fetuin und MPN etwas aussagen zu können, war es notwendig, die Abspaltung von Acetylneuraminsäure in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zu untersuchen.
Hierzu wurden in die Teste ansteigende Konzentrationen von Fetuin und MPN eingesetzt.
Für den Fetuin Test wurde ein Konzentrationsbereich von $1{,}04 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter bis $6{,}6 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter Fetuin, entsprechend $1{,}41 \cdot 10^{-4}$ - $9{,}0 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter abspaltbarer Acetylneuraminsäure, gewählt. Um eine gleichmäßige Abstufung in dieser Konzentrationsreihe zu erhalten, konnte nicht mehr die Fetuin-Stammlösung (2.1.1.) verwendet werden, sondern es war nötig, zwei neue Lösungen anzusetzen, die eine Konzentration von 5,0 mg/ml Fetuin bzw. 40,0 mg/ml Fetuin hatten. Durch Entnahme von entsprechenden Millilitermengen konnten in den Fetuin Test gleichmäßig ansteigende Konzentrationen des Substrates eingesetzt werden.
Für den MPN (Folin) Test wurde eine ansteigende MPN - Konzentration von $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter bis $8{,}0 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter MPN gewählt. Bei diesem Substrat entspricht die Konzentrationsangabe der Konzentration an abspaltbarer Acetylneuraminsäure. Auch für den MPN (Folin) Test konnte nicht mehr die MPN-Stammlösung (2.1.9.) eingesetzt werden.

Es wurden zwei neue Lösungen gewählt, die eine Konzentration von 1,057 mg/ml MPN und 4,23 mg/ml MPN hatten. Durch Entnahme der entsprechenden Milliliternengen konnten in den Folin Test ansteigende Substratkonzentrationen eingesetzt werden.

Der Präzipitat Test konnte unter diesen Testbedingungen nicht eingesetzt werden, da die zu erwartenen Mengen an abgespaltener Acetylneuraminsäure über 20 µg liegen würden. Aufgrund des in 2.2.3. für den Präzipitat Test beschriebenen Näherungsverfahrens, war dem Test nur eine Gültigkeit bis 20 µg abgespaltener Acetylneuraminsäure eingeräumt worden.

Als Enzymmengen an Bakterien- bzw. Virusneuraminidase wurden wie schon in 3.1. 0,1 ml der Bakterienneuraminidase lösung (2.1.8.) und 0,1 ml der Virusneuraminidase (2.1.17.) eingesetzt. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich,wurden damit nicht einheitliche Enzymeinheiten eingesetzt. Diese Einschränkung mußte gemacht werden, da aus versuchstechnischen Gründen nur ganzzahlig Vielfache von 0,1 ml eingesetzt werden konnten. Die absolute Enzymaktivität war allerdings in dieser Versuchsanordnung nicht von großer Bedeutung, da hier die Affinität des Substrates zum Enzym untersucht werden sollte. Diese Wechselbeziehung ist aber unabhängig von der Enzymaktivität.

Auch bei diesen Testen liefen Kontrollen mit. Es wurden die Neuraminsäurelösung (2.1.7.) und die 3-Methoxyphenollösung (2.1.10.) in die Teste eingesetzt. Erhielt man mit diesen Proben die Standardwerte, dann wurden die zugehörigen Testreihen ausgewertet. Als weitere Kontrollen liefen in Blindversuchen die Enzyme Bakterien- und Virusneuraminidase mit. Wie schon in 3.1. und 3.2. zeigten auch in diesem Versuch die Leerwerte der Substrate die höchsten Extinktionen. Da bei den vorliegenden Versuchsbedingungen mit ansteigenden Substratkonzentrationen gearbeitet wurde, mußte von jeder eingesetzten Substratkonzentration in einem Blindversuch der Leerwert bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden von den in den Testreihen erhaltenen Extinktionen als background abgezogen.

Die Teste wurden wie in 2.2.1. und 2.2.2. beschrieben durchgeführt. Die Testreihen wurden in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Berechnung der µg abgespaltener Acetylneuraminsäure wurde wie in den Testbeschreibungen aufgeführt vorgenommen.
Als Inkubationszeit wurden 15 Minuten gewählt, da bei dieser Zeit, wie die Abbildung 8 zeigt, die Reaktionsgeschwindigkeit doch annähernd der Anfangsgeschwindigkeit ist. Außerdem wäre es versuchstechnisch nur sehr schwer gewesen, kürzere Inkubationszeiten zu messen (Drzeniek,R. 1970).

Substratkonzentration(Mol/L)	Fetuin/Virus			Fetuin/Bakter.		
	E	µmol	Mol/L	E	µmol	MoL/L
$1{,}40 \cdot 10^{-4}$	0,060	0,0042	$0{,}84 \cdot 10^{-5}$	0,302	0,0213	$4{,}26 \cdot 10^{-5}$
$2{,}80 \cdot 10^{-4}$	0,120	0,0084	$1{,}68 \cdot 10^{-5}$	0,405	0,0286	$5{,}72 \cdot 10^{-5}$
$5{,}61 \cdot 10^{-4}$	0,217	0,0153	$3{,}06 \cdot 10^{-5}$	0,495	0,0349	$6{,}98 \cdot 10^{-5}$
$8{,}41 \cdot 10^{-4}$	0,306	0,0216	$4{,}32 \cdot 10^{-5}$	0,547	0,0386	$7{,}72 \cdot 10^{-5}$
$11{,}25 \cdot 10^{-4}$	0,410	0,0289	$5{,}78 \cdot 10^{-5}$	0,572	0,0404	$8{,}08 \cdot 10^{-5}$
$22{,}50 \cdot 10^{-4}$	0,846	0,0598	$11{,}96 \cdot 10^{-5}$	0,703	0,0497	$9{,}94 \cdot 10^{-5}$
$33{,}75 \cdot 10^{-4}$	1,247	0,0881	$17{,}62 \cdot 10^{-5}$	0,741	0,0523	$10{,}46 \cdot 10^{-5}$
$45{,}00 \cdot 10^{-4}$	1,577	0,1114	$22{,}78 \cdot 10^{-5}$	0,810	0,0572	$11{,}44 \cdot 10^{-5}$
$56{,}27 \cdot 10^{-4}$	1,858	0,1313	$26{,}26 \cdot 10^{-5}$	0,800	0,0565	$11{,}34 \cdot 10^{-5}$
$67{,}43 \cdot 10^{-4}$	1,666	0,1177	$23{,}54 \cdot 10^{-5}$	0,714	0,0504	$10{,}08 \cdot 10^{-5}$
$78{,}77 \cdot 10^{-4}$	1,337	0,0945	$18{,}90 \cdot 10^{-5}$	0,410	0,0289	$5{,}78 \cdot 10^{-5}$
$89{,}89 \cdot 10^{-4}$	1,022	0,0722	$14{,}22 \cdot 10^{-5}$	0,241	0,0170	$3{,}40 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 6 Die angegebenen Substratkonzentrationen beziehen sich auf Mol/Liter abspaltbarer Acetylneuraminsäure in 0,5 ml Ansatz; Inkubationszeit 15 Minuten

Substrat-Konzentration(Mol/L)	MPN(Folin)/Virus E	µmol	Mol/L	MPN(Folin)/Bakter. E	µmol	MOL/L
$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	0,060	0,0102	$2{,}04 \cdot 10^{-5}$	0,027	0,0046	$0{,}92 \cdot 10^{-5}$
$5{,}0 \cdot 10^{-4}$	0,140	0,0239	$4{,}78 \cdot 10^{-5}$	0,054	0,0092	$1{,}84 \cdot 10^{-5}$
$7{,}5 \cdot 10^{-4}$	0,218	0,0372	$7{,}44 \cdot 10^{-5}$	0,082	0,0140	$2{,}80 \cdot 10^{-5}$
$10{,}0 \cdot 10^{-4}$	0,230	0,0391	$7{,}82 \cdot 10^{-5}$	0,144	0,0246	$4{,}92 \cdot 10^{-5}$
$20{,}0 \cdot 10^{-4}$	0,506	0,0864	$17{,}28 \cdot 10^{-5}$	0,175	0,0299	$5{,}98 \cdot 10^{-5}$
$30{,}0 \cdot 10^{-4}$	0,814	0,1391	$27{,}82 \cdot 10^{-5}$	0,141	0,0240	$4{,}80 \cdot 10^{-5}$
$40{,}0 \cdot 10^{-4}$	1,097	0,1874	$37{,}48 \cdot 10^{-5}$	0,166	0,0283	$5{,}66 \cdot 10^{-5}$
$50{,}0 \cdot 10^{-4}$	1,435	0,2452	$49{,}04 \cdot 10^{-5}$	0,128	0,0218	$4{,}36 \cdot 10^{-5}$
$60{,}0 \cdot 10^{-4}$	1,625	0,2777	$55{,}54 \cdot 10^{-5}$	0,113	0,0193	$3{,}86 \cdot 10^{-5}$
$70{,}0 \cdot 10^{-4}$	1,890	0,3230	$64{,}60 \cdot 10^{-5}$	0,172	0,0293	$5{,}86 \cdot 10^{-5}$
$80{,}0 \cdot 10^{-4}$	(nicht mehr meßbar)			0,085	0,0145	$2{,}90 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 7 Die angegebenen Substratkonzentrationen beziehen sich auf Mol/Liter abspaltbarer Acetylneuraminsäure in 0,5 ml Ansatz; Inkubationszeit 15 Minuten

Aus der Abbildung 9 ist zu ersehen, daß bei der Enzym-Substratkombination MPN(Folin)/Virusenzym im eingesetzten Konzentrationsbereich eine lineare Beziehung besteht zwischen der eingesetzten Substratkonzentration und den abgespaltenen Mengen an Acetylneuraminsäure. Für die Kombination Fetuin/Virusenzym ergibt sich ein linearer Anstieg bis zu einem Maximum, nach dessen Erreichen die Kurve rückläufig wird. Die Bakterienneuraminidase zeigt sowohl mit dem Substrat Fetuin als auch MPN schon bei niedrigen Substratkonzentrationen einen rückläufigen Verlauf.
Bildet man von den eingesetzten Substratkonzentrationen und von den erhaltenen Mengen an abgespaltener Acetylneuraminsäure die reziproken Werte, so kann man die Meß-

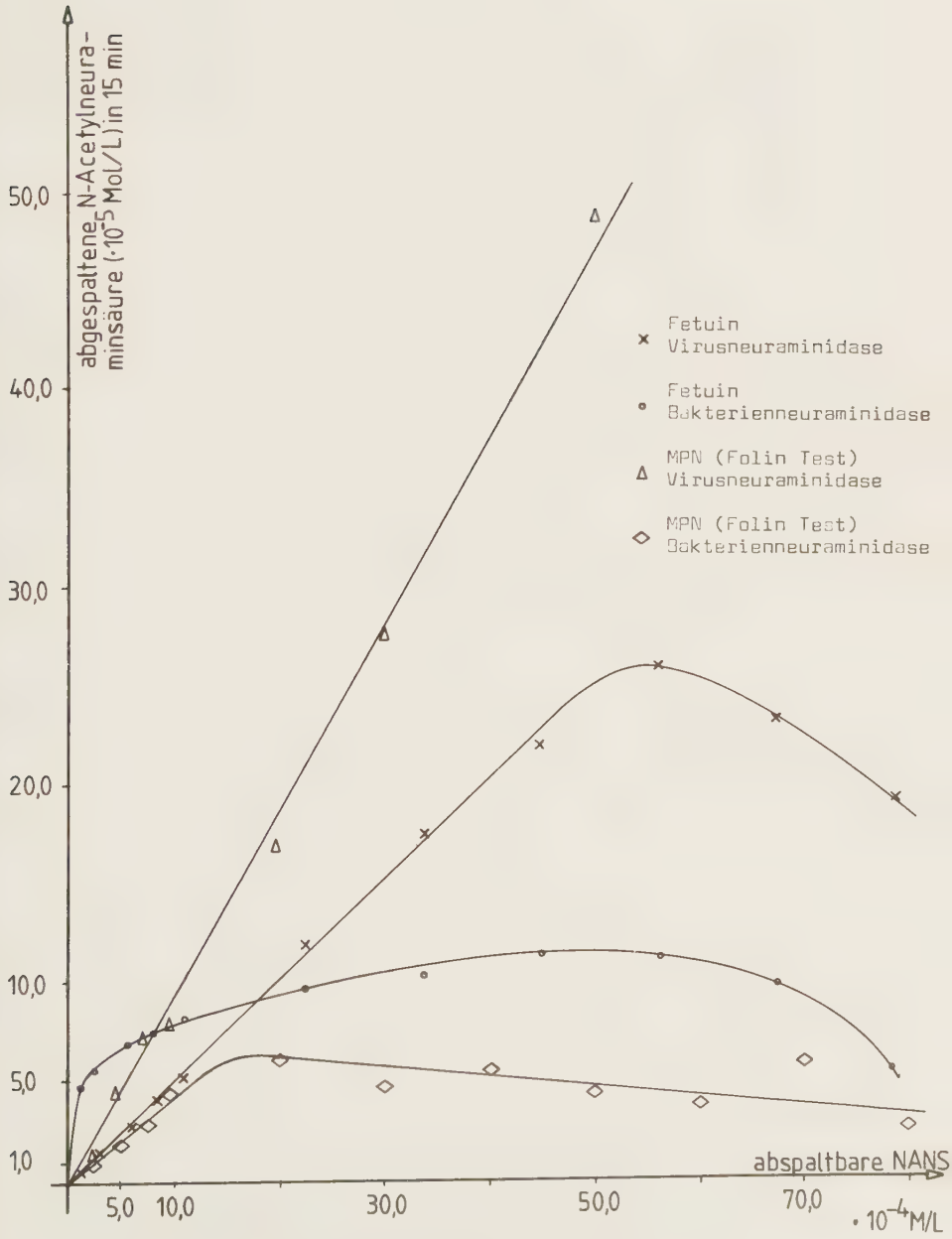


Abbildung 9 Abspaltung von Acetylneuraminsäure in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Inkubationszeit 15 Minuten

Substratkonzentration (Mol/L)	$\frac{1}{S}$	Fetuin Virus $\frac{1}{V}$	Fetuin Bakt. $\frac{1}{V}$
$1{,}40 \cdot 10^{-4}$	$71{,}42 \cdot 10^{2}$	$11{,}9 \cdot 10^{4}$	$2{,}4 \cdot 10^{4}$
$2{,}80 \cdot 10^{-4}$	$35{,}71 \cdot 10^{2}$	$5{,}95 \cdot 10^{4}$	$1{,}74 \cdot 10^{4}$
$5{,}61 \cdot 10^{-4}$	$17{,}82 \cdot 10^{2}$	$3{,}26 \cdot 10^{4}$	$1{,}43 \cdot 10^{4}$
$8{,}41 \cdot 10^{-4}$	$11{,}89 \cdot 10^{2}$	$2{,}31 \cdot 10^{4}$	$1{,}29 \cdot 10^{4}$
$11{,}25 \cdot 10^{-4}$	$8{,}88 \cdot 10^{2}$	$1{,}73 \cdot 10^{4}$	$1{,}23 \cdot 10^{4}$
$22{,}50 \cdot 10^{-4}$	$4{,}44 \cdot 10^{2}$	$0{,}84 \cdot 10^{4}$	$1{,}00 \cdot 10^{4}$
$33{,}75 \cdot 10^{-4}$	$2{,}96 \cdot 10^{2}$	$0{,}56 \cdot 10^{4}$	$0{,}95 \cdot 10^{4}$
$45{,}00 \cdot 10^{-4}$	$2{,}22 \cdot 10^{2}$	$0{,}45 \cdot 10^{4}$	$0{,}87 \cdot 10^{4}$
$56{,}27 \cdot 10^{-4}$	$1{,}77 \cdot 10^{2}$	$0{,}38 \cdot 10^{4}$	—

Tabelle 8 Die reziproken Werte 1/S und 1/V sind in $\frac{1}{\text{Mol/Liter}}$ angegeben

Substratkonzentration (Mol/Liter)	$\frac{1}{S}$	Folin Virus $\frac{1}{V}$	Folin Bakter. $\frac{1}{V}$
$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	$40{,}0 \cdot 10^{2}$	$4{,}90 \cdot 10^{4}$	$10{,}86 \cdot 10^{4}$
$5{,}0 \cdot 10^{-4}$	$20{,}0 \cdot 10^{2}$	$2{,}09 \cdot 10^{4}$	$5{,}43 \cdot 10^{4}$
$7{,}5 \cdot 10^{-4}$	$13{,}3 \cdot 10^{2}$	$1{,}34 \cdot 10^{4}$	$3{,}57 \cdot 10^{4}$
$10{,}0 \cdot 10^{-4}$	$10{,}0 \cdot 10^{2}$	$1{,}00 \cdot 10^{4}$	$2{,}03 \cdot 10^{4}$
$20{,}0 \cdot 10^{-4}$	$5{,}0 \cdot 10^{2}$	$0{,}57 \cdot 10^{4}$	$1{,}67 \cdot 10^{4}$
$30{,}0 \cdot 10^{-4}$	$3{,}3 \cdot 10^{2}$	$0{,}35 \cdot 10^{4}$	$2{,}08 \cdot 10^{4}$
$40{,}0 \cdot 10^{-4}$	$2{,}5 \cdot 10^{2}$	$0{,}26 \cdot 10^{4}$	$1{,}76 \cdot 10^{4}$
$50{,}0 \cdot 10^{-4}$	$2{,}0 \cdot 10^{2}$	$0{,}20 \cdot 10^{4}$	$2{,}29 \cdot 10^{4}$
$60{,}0 \cdot 10^{-4}$	$1{,}6 \cdot 10^{2}$	$0{,}18 \cdot 10^{4}$	$2{,}59 \cdot 10^{4}$
$70{,}0 \cdot 10^{-4}$	$1{,}4 \cdot 10^{2}$	$0{,}15 \cdot 10^{4}$	$1{,}70 \cdot 10^{4}$
$80{,}0 \cdot 10^{-4}$	$1{,}25 \cdot 10^{2}$		$3{,}40 \cdot 10^{4}$

Tabelle 9 Die reziproken Werte 1/S und 1/V sind in $\frac{1}{\text{Mol/Liter}}$ angegeben

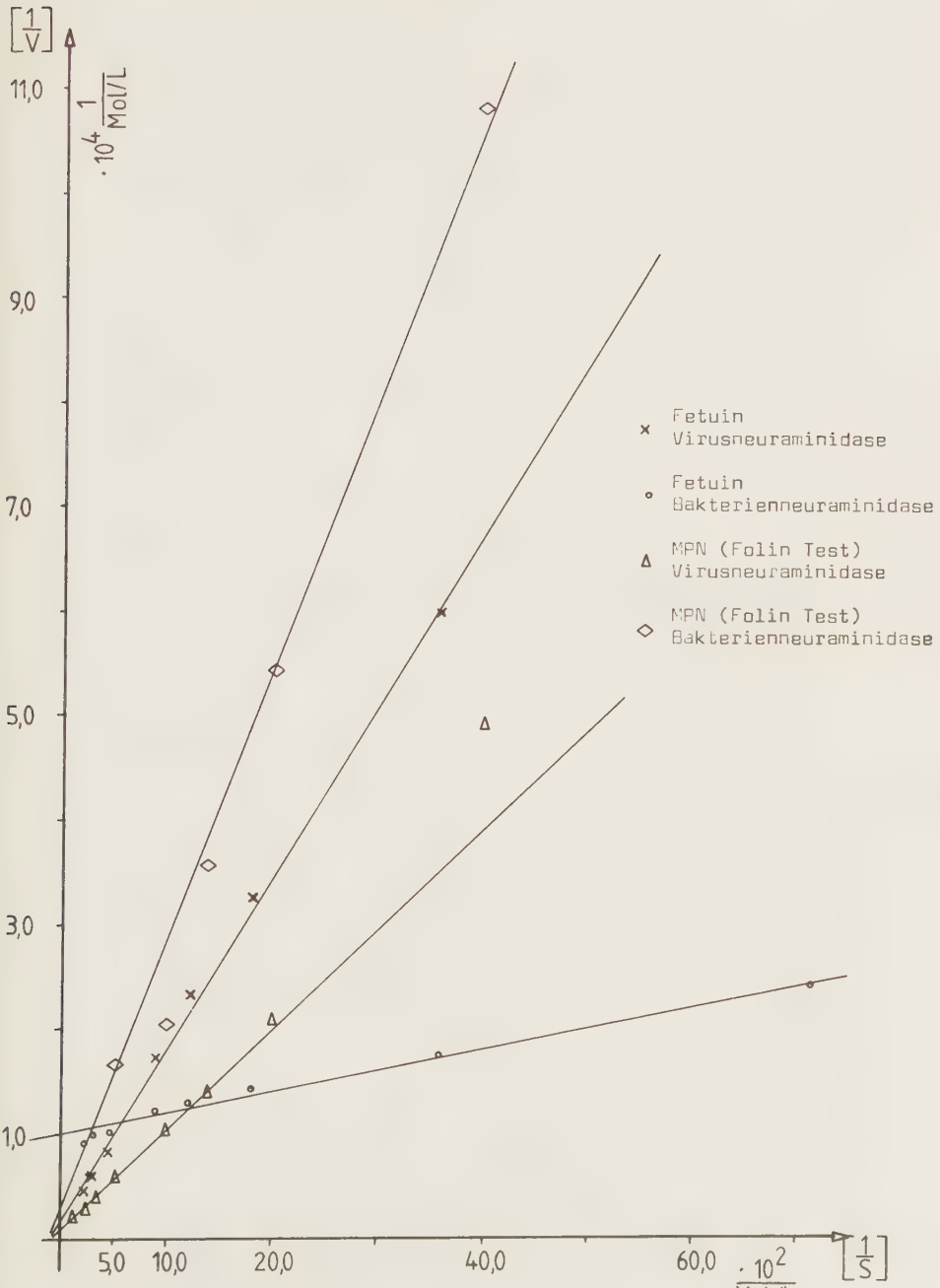


Abbildung 10 Abspaltung von Acetylneuraminsäure in Abhängigkeit von der Substratkonzentration: Auftragung nach Lineweaver und Burk

ergebnisse nach Lineweaver und Burk (Lineweaver, Burk 1934) auftragen. Die Substratkonzentrationen erscheinen dann als 1/S auf der Abszisse, die abgespaltenen Mengen an Acetylneuraminsäure als 1/V auf der Ordinate. Zweck dieser Umformung ist es, für die in Abbildung 9 dargestellten Kurven Geraden zu erhalten, mit deren Hilfe man leichter weitere kinetischen Daten ermitteln kann. Die umgerechneten Werte sind den Tabellen 8 und 9 zu entnehmen.

Die allgemeine Formel für die Geschwindigkeit einer Enzymreaktion lautet(Buddecke, Lehrbuch der Biochemie):

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_M \cdot S} \qquad (A)$$

(v = Geschwindigkeit der Reaktion, V_{max} = erreichbare Maximalgeschwindigkeit, K_M = Michaeliskonstante, S = Substratkonzentration)

Nach dem Umformen dieser Gleichung erhält man:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (B)$$

Diese Gleichung ist jedoch nichts anderes als der mathematische Ausdruck für die graphische Darstellung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion von der Substratkonzentration in doppelt reziproker Auftragung nach Lineweaver-Burk (Abbildung 10). Um dieses zu verdeutlichen, kann man die oben angeführte Gleichung der allgemeinen Gleichung einer Geraden gegenüberstellen:

$$y = a \cdot x + b$$

Somit entspricht $a = K_M/V_{max}$ und $b = 1/V_{max}$.

Damit gibt uns der Abstand des Schnittpunktes der Geraden mit der Ordinate den Wert b und damit $1/V_{max}$ an. Entnimmt man der Abbildung 10 die Werte für die Schnittpunkte der Geraden mit der Ordinate, so ergeben sich folgende $1/V_{max}$ - Werte.

Fetuin / Virus : $1/V_{max} = 0,15 \cdot 10^{4}$ L/Mol

Fetuin / Bakter. : $1/V_{max} = 1,0 \cdot 10^{4}$ L/Mol

MPN(Folin)/Virus : $1/V_{max} = 0,1 \cdot 10^{4}$ L/Mol

MPN(Folin)/Bakter.: $1/V_{max} = 0,3 \cdot 10^{4}$ L/Mol

Durch Bildung der reziproken Werte erhält man V_{max} :

Fetuin / Virus : $V_{max} = 6,6 \cdot 10^{-4} = 66 \cdot 10^{-5}$ Mol/L

Fetuin / Bakter. : $V_{max} = 1,0 \cdot 10^{-4} = 10 \cdot 10^{-5}$ Mol/L

MPN(Folin)/Virus : $V_{max} = 10,0 \cdot 10^{-4} = 100 \cdot 10^{-5}$ MOL/L

MPN(Folin)/Bakter.: $V_{max} = 3,0 \cdot 10^{-4} = 30 \cdot 10^{-5}$ Mol/L

Mit Hilfe dieser V_{max} - Werte ist es nun möglich K_M zu bestimmen.

Wie aus Gleichung (8) ersichtlich, entspricht

$$a = \frac{K_M}{V_{max}}$$

Da a aber die Steigung der Geraden angibt und die Steigung gleich ihrem $\tan\alpha$ - Wert ist, ergibt sich:

$$\tan\alpha = \frac{K_M}{V_{max}} \qquad K_M = V_{max} \cdot \tan\alpha$$

Den $\tan\alpha$ erhält man, indem man bei jeder der in Abbildung 10 aufgeführten Geraden ein Steigungsdreieck einzeichnet und den Wert der Gegenkathete durch denjenigen der An-Kathete dividiert. Multipliziert man nun diese Werte mit dem zugehörigen V_{max} so erhält man K_M .

Fetuin / Virus : $K_M = 66 \cdot 10^{-5} \cdot 1,69 \cdot 10^{1} = 1,11 \cdot 10^{-2}$ Mol/L

Fetuin / Bakter. : $K_M = 10 \cdot 10^{-5} \cdot 0,20 \cdot 10^{1} = 2,0 \cdot 10^{-4}$ Mol/L

MPN(Folin)/Virus : $K_M = 100 \cdot 10^{-5} \cdot 0,1 \cdot 10^{2} = 1,0 \cdot 10^{-2}$ Mol/L

MPN(Folin)/Bakter.: $K_M = 30 \cdot 10^{-5} \cdot 0,25 \cdot 10^{2} = 0,75 \cdot 10^{-2}$ Mol/L

Die Berechnung der K_M - Werte wurde bewußt mit Hilfe der V_{max} - Werte durchgeführt. Es ist nun auch möglich, die Schnittpunkte der Geraden mit der Abszisse zu bestimmen und den erhaltenen $1/K_M$ - Wert in K_M umzurechnen. Variert man allerdings die Steigung der Geraden beim Anlegen an die Meßpunkte, so ergeben sich große Unterschiede bei dem $1/K_M$ - Wert. Der Fehler bei den V_{max} - Werten dagegen ist erheblich geringer.

Die erhaltenen K_M - Werte zeigen, daß bei den Enzym/Substratkombinationen Fetuin/Virusenzym und MPN/Virusenzym bzw. MPN/Bakterienenzym annähernd gleiche Michaeliskonstanten erreicht werden. Das bedeutet, daß trotz des Unterschiedes in den Molekulargewichten der Substrate bei gleicher Konzentration an abspaltbarer Acetylneuraminsäure halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wird. Der K_M - Wert für die Enzym-Substrat-Kombination Fetuin/Bakterienenzym liegt um den Faktor 10^2 niedriger als bei den übrigen drei Kombinationen. Das bedeutet, daß bei dieser Kombination schon bei einer 100fach kleineren Substratkombination halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wird.

3.4. Bestimmung der Neuraminidaseaktivitäten einiger Parainfluenza Typ 1 (Sendai) Viren mit den Substraten Fetuin und MPN .

In den Versuchen des Abschnittes 3.1., 3.2. und 3.3. war die Virusneuraminidase des Stammes Z eingesetzt worden. In diesem Abschnitt sollen deshalb weitere Vertreter der Sendai Viren auf ihre Enzymaktivitäten untersucht werden. Die Bestimmung soll jeweils mit dem Substrat Fetuin und MPN durchgeführt werden.
Die zu testenden Virusstämme hatten die Bezeichnungen:

MN , Fushimi , Obayashi , Z und 6/94
(2.1.16.)

Im Gegensatz zu den bisherigen Verfahren, wurde von den einzusetzenden Virusstämmen zuerst ein HA - Titer (2.2.4.) bestimmt. Dies geschah unter dem Gesichtspunkt, daß die Parainfluenza Viren nicht zwei verschiedene Moleküle für Neuraminidase und Hämagglutinin aufweisen, sondern daß die Neuraminidaseaktivitäten und die hämagglutinierenden Eigenschaften von einem einzigen Protein bewirkt werden.

Die Virusstämme wiesen folgende HA - Titer auf:

MN	128
Fushimi	128
Obayashi	64
Z	64
6/94	128

Aufgrund dieser HA - Titer wurden die Viruslösungen so verdünnt, daß sie alle einen HA - Titer von 32 hatten. Diese Verdünnungsstufe wurde dann nochmals in einem Hämagglutinationstest (2.2.4.) überprüft.

3.4.1. Bestimmung der Neuraminidaseaktivität einiger Parainfluenza Typ 1 (Sendai) Viren mit dem Substrat Fetuin

Diese Versuchsreihe wurde mit dem Substrat Fetuin durchgeführt, wobei wie in 3.1 eine Konzentration von 0,9 mg Fetuin pro 0,5 ml Ansatz. Die Versuche wurde wie in 2.2.1. be-

schrieben durchgeführt.
Als Kontrollen liefen die Neuraminsäurelösung (2.1.7.) und in je einem Blindversuch die Virus- bzw. Substratmengen mit. Da die Substratkonzentrationen im Blindversuch die weitaus größeren Leerwerte erbrachten, wurden von allen Meßwerten dieser Wert als "background" abgezogen.
Die Auswertung der Testreihen erfolgte nur, wenn die Neuraminsäureprobe den Standardwert erreichte.
Die erhaltenen Meßwerte sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

ml Enzym	0,o5	0,1o	0,15	0,2o	0,25	0,3o	0,35	0,4
E	0,o88	0,122	0,144	0,176	0,2o1	0,223	0,253	0,262
(MN) µmol	0,oo62	0,oo86	0,1o1	0,o124	0,o142	0,o157	0,o178	0,o185
µg	1,91	2,56	3,12	3,83	4,38	4,85	5,5o	5,71
E	0,189	0,296	0,381	0,461	0,539	0,597	0,654	0,693
(Fu) µmol	0,o133	0,o2o9	0,o269	0,o325	0,o422	0,o462	0,468	0,489
µg	4,1o	6,45	8,31	1o,o4	11,77	13,o3	14,27	15,11
E	0,o68	0,o83	0,o97	0,1o6	0,119	0,129	0,145	0,152
(Ob) µmol	0,oo48	0,oo58	0,oo68	0,oo74	0,oo84	0,oo91	0,o1o2	0,o1o7
µg	1,48	1,79	2,1o	2,28	2,59	2,81	3,15	3,3o
E	0,231	0,358	0,447	0,531	0,573	0,688	0,751	0,799
(Z) µmol	0,o163	0,o253	0,o316	0,o375	0,o4o5	0,o486	0,o53o	0,o564
µg	5,o3	7,81	9,76	11,58	12,51	15,o1	16,37	17,42
E	0,o61	0,o74	0,o86	0,o92	0,1o1	0,1o9	0,12o	0,124
(6/94) µmol	0,oo43	0,oo52	0,oo6o	0,oo65	0,oo71	0,oo77	0,oo84	0,oo87
µg	1,32	1,6o	1,85	2,oo	2,19	2,37	2,59	2,68

Tabelle 10 Die angegebenen µmol und µg - Werte beziehen sich auf o,5 ml Ansatz

Wie die Abbildung 11 zeigt, besitzen die Stämme Z und Fu die höchsten Aktivitäten. Mn liegt im Mittelfeld und 6/94 und Ob zeigen die geringsten.

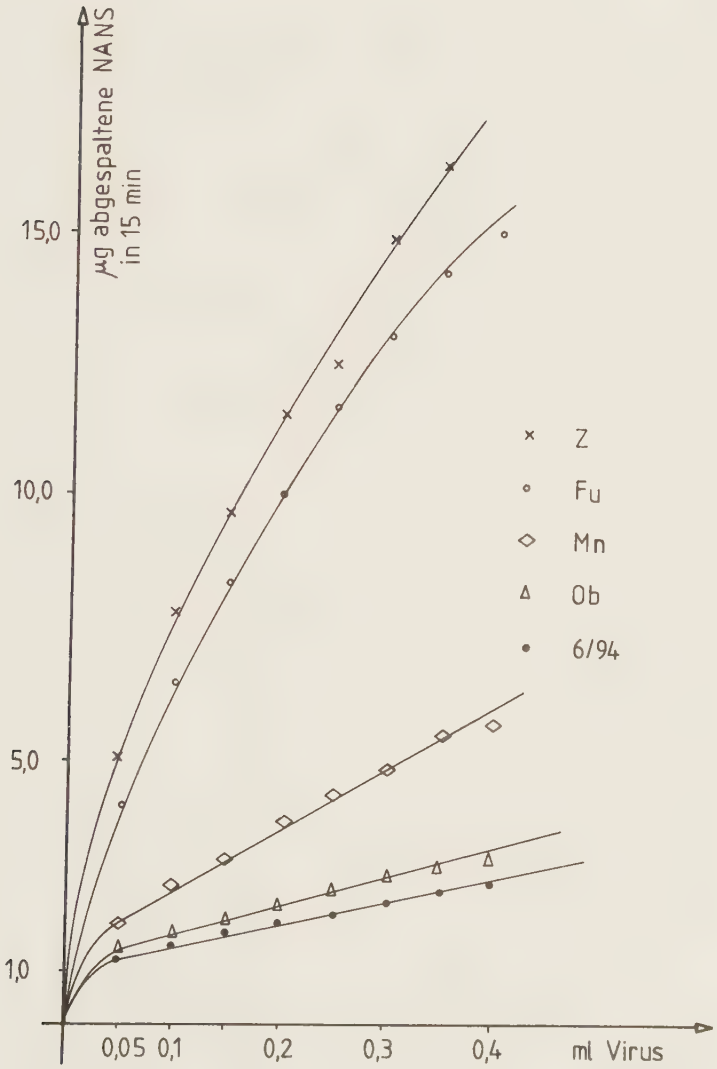


Abbildung 11 Vergleich der Neuraminidaseaktivität verschiedener Parainfluenza Typ 1 Viren mit je 32 HA mit dem Substrat Fetuin (Fetuin Test)

3.4.2. Bestimmung der Neuraminidaseaktivität einiger Parainfluenza Typ 1 (Sendai) Viren mit dem Substrat MPN

Diese Versuchsreihe wurde mit dem Substrat MPN durchgeführt, wobei wie in 3.1. eine Konzentration von 0,1036 mg MPN pro 0,5 ml Ansatz gewählt wurde. Die Versuche wurden wie in 2.2.2. beschrieben durchgeführt.
Als Kontrollen liefen die 3-Methoxyphenollösung (2.1.10.) und in je einem Blindversuch die Virus- bzw. Substratmenge mit. Da die Substratkonzentrationen im Blindversuch die weitaus größeren Leerwerte erbrachten, wurden von allen Meßwerten dieser Wert als "background" abgezogen.
Die Auswertung der Testreihen erfolgte nur, wenn die Neuraminsäureprobe den Standardwert erreichte.
Die erhaltenen Meßwerte sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

ml Enzym		0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
E		0,001	0,012	0,010	0,011	0,020	0,025	0,022	0,029
(Bb)	µmol	0,0017	0,0021	0,0017	0,0018	0,0035	0,0043	0,0038	0,0050
	µg	0,53	0,65	0,53	0,58	1,08	1,32	1,17	1,56
E		0,036	0,077	0,114	0,161	0,215	0,230	0,253	0,289
(Fu)	µmol	0,0061	0,0131	0,0196	0,0275	0,0367	0,0393	0,0432	0,0493
	µg	1,9	4,05	6,05	8,5	11,4	12,2	13,4	15,3
E		0,043	0,080	0,104	0,143	0,185	0,206	0,255	0,274
(MN)	µmol	0,0073	0,0137	0,0177	0,0244	0,0316	0,0352	0,0435	0,0468
	µg	2,25	4,20	5,47	7,53	9,76	10,87	13,44	14,46
E		0,012	0,020	0,042	0,043	0,076	0,079	0,103	0,104
(Z)	µmol	0,0020	0,0034	0,0071	0,0073	0,0114	0,0135	0,0176	0,0177
	µg	0,61	1,05	2,19	2,25	3,52	4,17	5,44	5,47
E		0,008	0,009	0,027	0,032	0,041	0,047	0,057	0,063
(6/94)	µmol	0,0015	0,0016	0,0047	0,0055	0,0071	0,0081	0,0097	0,0108
	µg	0,45	0,5	1,45	1,7	2,2	2,5	3,0	3,35

Tabelle 11

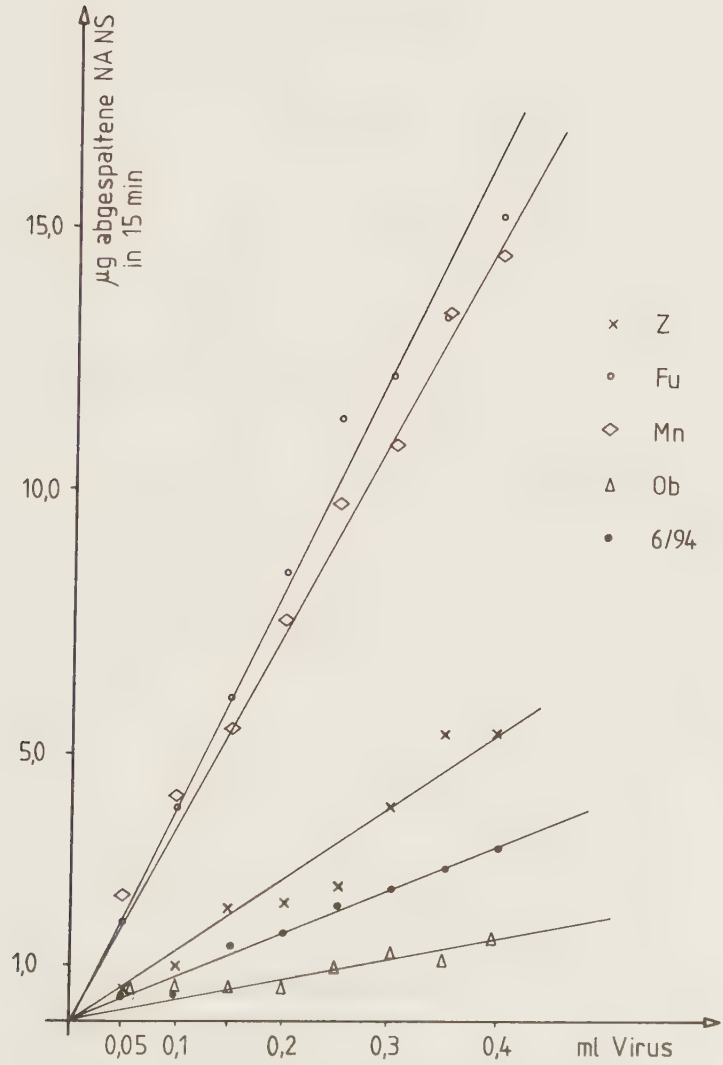


Abbildung 12 Vergleich der Neuraminidaseaktivität verschiedener Parainfluenza Typ 1 Viren mit je 32 HA mit dem Substrat MPN (Folin Test)

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Abschnitte 3.1., 3.2. und 3.3.

Die in den Kapiteln 3.1., 3.2. und 3.3. geschilderten Testverfahren, zeigen die Schwierigkeiten, die es bereitet, für die jeweilige Fragestellung geeignete und sinnvolle Ausgangsbedingungen zu finden, um Enzymaktivitäten zweier Enzyme verschiedener Herkunft mit Substraten unterschiedlicher Molekülstruktur zu bestimmen.
Bei der Überprüfung der Abhängigkeit der Enzymmenge an Virus- bzw. Bakterienneuraminidase von der Enzymaktivität zeigte sich eine Proportionalität bei den Enzym - Substratkombinationen MPN/Virusenzym und Fetuin/Bakterienenzym. Ebenso konnte man feststellen, daß bei diesen Kombinationen alle eingesetzten Testverfahren annähernd gleiche Ergebnisse erbrachten. Damit erwies sich auch die Entscheidung als richtig, die Substratkonzentrationen nach der Menge der abspaltbaren Neuraminsäure einzusetzen.
Bei der Überprüfung der Kinetik der beiden Enzymarten fiel auf, daß wiederum die Enzym - Substrat - Kombinationen MPN/Virusenzym und Fetuin/Bakterienenzym gleiche Reaktionsgeschwindigkeiten entwickelten. Die durch die kinetischen Untersuchungen erhaltenen Daten ermöglichten es dann, die für Enzymbetrachtungen wichtige Michaeliskonstante K_M zu bestimmen. Mit Hilfe dieser Konstanten ist es möglich folgende Aussagen zu treffen:

1. Sie ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat.
2. Sie ist entscheidend für die Beurteilung der Wirkungsweise von Enzymhemmern.
3. Sie ermöglicht die Berechnung derjenigen Substratkonzentration, die zum Erreichen maximaler Reaktionsgeschwindigkeit ist.

Hier zeigte sich, daß die Enzym - Substrat - Kombinationen Fetuin/Virusenzym, MPN/Virusenzym und MPN/Bakterienenzym mit ungefähr $1 \cdot 10^{-2}$ Mol/L einen verhältnismäßig großen K_M - Wert erbrachten. Das heißt, die Substratkonzentration bei der halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit auftritt, liegt nicht mehr in dem üblichen "biologischen" Bereich von 10^{-3} bis 10^{-5} Mol/L . Nur die Kombination Fetuin/Bak-

terienenzym mit einem K_M - Wert von $2 \cdot 10^{-4}$ Mol/L liegt größenordnungsmäßig in diesem Bereich. Es fragt sich nun, ob die bei den drei Kobinationen Fetuin/Virusenzym, MPN/Virusenzym und MPN/Bakterienenzym erhaltenen K_M - Werte nicht daraufhinweisen, daß die Affinität zwischen Substrat und Enzym herabgesetzt ist oder sogar eine Hemmung vorliegt.

Daß es sich nicht um eine Substrathemmung handelt, geht aus der Abbildung 10 hervor. In diesem Fall müßten sich die Geraden bei niedrigen 1/S - Werten asymptotisch der Ordinate nähern. Bei der Enzym - Substrat - Kombination MPN/Virusenzym bzw. Fetuin/Virusenzym käme eine kompetitive Hemmung in Frage, die z.B. durch verbliebene Eiweißrückstände in der Viruslösung nach der Virusreinigung zu erklären wäre. Bei der Kombination MPN/Bakterienenzym scheint eine herabgesetzte Affinität zu bestehen.

In den Abschnitten 3.1. und 3.2. war bei den Versuchsreihen eine Substratkonzentration von $4{,}9 \cdot 10^{-4}$ Mol/L eingesetzt worden, die, wie sich aus dem Schaubild 9 ergibt, niedriger war, als diejenigen Konzentrationen bei denen ein rückläufiger Kurvenverlauf aufgetreten war. Setzt man nun diese Substratkonzentration von $4{,}9 \cdot 10^{-4}$ Mol/L zu den bei den entsprechenden Enzym-Substrat-Kombinationen erhaltenen K_M-Werten ins Verhältnis, so erhält man folgendes Ergebnis:

Fetuin/Virusenzym	Substratkonzentration/K_M	=	1/22
Fetuin/Bakterienenzym	Substratkonzentration/K_M	=	2,4
MPN/Virusenzym	Substratkonzentration/K_M	=	1/20
MPN/Bakterienenzym	Substratkonzentration/K_M	=	1/15

Aus diesen Verhältniswerten ist ersichtlich, daß die eingesetzten Substratkonzentrationen erheblich niedriger waren, als die ermittelten K_M - Werte der Enzym-Substrat-Kombinationen. Das für die vergleichenden Betrachtungen in 3.1. und 3.2. nur die gewählte Substratkonzentration sinnvoll war, ergibt sich, wie oben schon erwähnt, aus dem Schaubild 9. Es bleibt also die Frage, welche Gesetzmäßigkeit zwischen der erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeit und der gewählten Substratkonzentration besteht.

Man unterscheidet bei der Enzymkinetik zwei verschiedene Reaktionsformen :

1. Ist die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration, so handelt es sich um eine Reaktion nullter Ordnung.
2. Ist die Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration abhängig, so handelt es sich um eine Reaktion erster Ordnung. (Rappoport, Biochemie)

Verläuft eine Enzymreaktion nach dem unter 1. angegebenen Kriterien, dann muß während der Reaktion eine Geschwindigkeit von 95% der Maximalgeschwindigkeit erreicht werden. Für die Geschwindigkeit gilt nach Gleichung A von Seite 38:

$$v = \frac{100 \cdot S}{K_M + S} \qquad (\text{ für } V_{max} = 100\ \%)$$

Für v = 95% ergibt sich dann:

$$95 = \frac{100 \cdot S}{K_M + S}$$

Dann ist $S = 19 \cdot K_M$

Will man also in einer enzymatischen Reaktion 95% der Maximalgeschwindigkeit erreichen, dann muß man Substratkonzentrationen einsetzen, die 19mal größer als K_M sind.
Aufgrund der erhaltenen K_M - Werte (S. 39) ist ersichtlich, daß in keiner Testreihe diese Substratkonzentration vorlag und damit keine Reaktion nullter Ordnung ablaufen konnte.
Es besteht nun die Möglichkeit, daß die Reaktionsgeschwindigkeiten und die Substratkonzentrationen in einem direktem proportionalem Verhältnis zueinander stehen (Reaktion erster Ordnung). Wenn dies der Fall sein sollte, dann müßte die Enzymreaktion durch die Gleichung

$$k \cdot t = \ln \frac{a}{a - x}$$

ausgedrückt werden können (Biochemica Fibel, Boehringer).
(K = Geschwindigkeitskonstante, a = Substratausgangskonz., x = verbrauchte Substratmenge zur Zeit t)

Um den graphischen Nachweis führen zu können, wurden die Werte der Tabelle 5 wie folgt umgerechnet und in die Gleichung eingesetzt.

Inkubationszeit	5	10	15	20	30
µg	3,85	4,77	6,10	6,60	8,85
Fetuin Mol/L	$0,25.10^{-4}$	$0,30.10^{-4}$	$0,39.10^{-4}$	$0,42.10^{-4}$	$0,57.10^{-4}$
Virus a/a - x	1,053	1,067	1,088	1,096	1,134
log a/a - x	$2,24.10^{-2}$	$2,81.10^{-2}$	$3,66.10^{-2}$	$3,98.10^{-2}$	$5,46.10^{-2}$
µg	1,82	3,92	5,59	6,82	9,14
Fetuin Mol/L	$0,11.10^{-4}$	$0,25.10^{-4}$	$0,36.10^{-4}$	$0,44.10^{-4}$	$0,59.10^{-4}$
Bakt. a/a - x	1,025	1,056	1,081	1,101	1,139
log a/a - x	$1,07.10^{-2}$	$2,36.10^{-2}$	$3,38.10^{-2}$	$4,17.10^{-2}$	$5,65.10^{-4}$
µg	1,97	3,9	5,78	6,81	9,31
MPN Mol/L	$0,12.10^{-4}$	$0,25.10^{-4}$	$0,37.10^{-4}$	$0,44.10^{-4}$	$0,60.10^{-4}$
Virus a/a - x	1,027	1,056	1,084	1,098	1,142
log a/a - x	$1,15.10^{-2}$	$2,36.10^{-2}$	$3,5.10^{-2}$	$4,06.10^{-2}$	$5,75.10^{-2}$
µg	1,3	2,66	5,35	7,61	7,87
MPN Mol/L	$0,08.10^{-4}$	$0,17.10^{-4}$	$0,34.10^{-4}$	$0,49.10^{-4}$	$0,50.10^{-4}$
Bakt. a/a - x	1,018	1,035	1,076	1,113	1,116
log a/a - x	$0,77.10^{-2}$	$1,49.10^{-2}$	$3,18.10^{-2}$	$4,64.10^{-2}$	$4,76.10^{-2}$

Tabelle 12 Die abgespaltenen Mengen an Acetylneuraminsäure aus Tabelle 5 wurden in Mol/L umgerechnet und in die Gleichung ln a/a - x eingesetzt;
$a = 4,9 \cdot 10^{-4}$; x = Mol/L

Die erhaltenen Werte wurden in einem Diagramm mit log a/a - x gegen t aufgetragen.

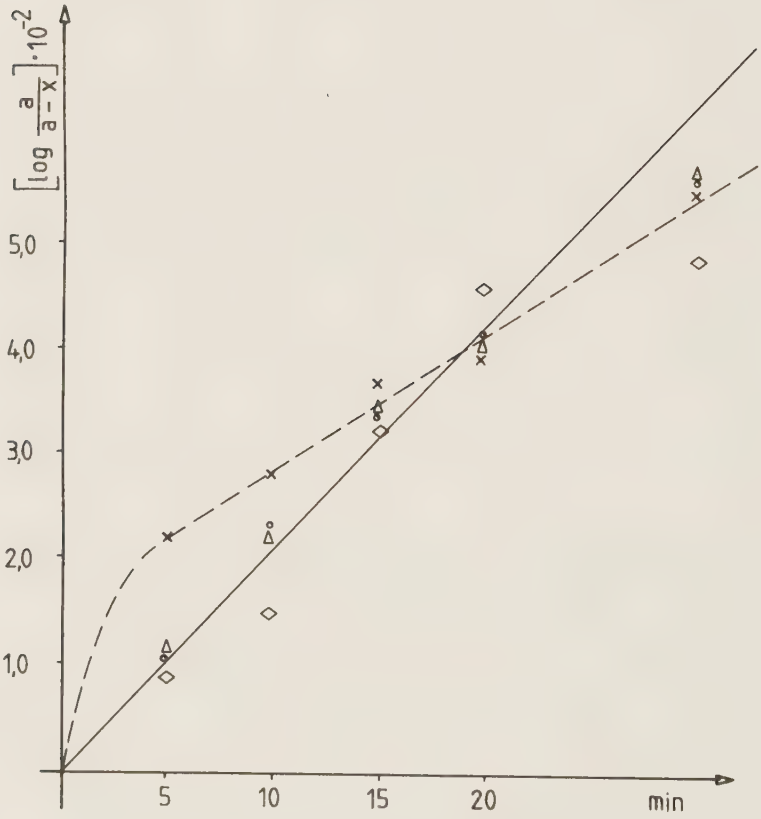


Abbildung 13 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, dargestellt durch die Auftragung der Inkubationszeit in Minuten gegen den logarithmischen Wert des Quotienten aus Ausgangskonzentration durch Restkonzentration

Wie die Abbildung 13 zeigt, ergeben sich für die Kombinationen MPN/Virusenzym, MPN/Bakterienenzym und Fetuin/Bakterienenzym Geraden im Schaubild. Das heißt damit, daß bei der eingesetzten Substratkonzentration von $4{,}9 \cdot 10^{-4}$ Mol/L die Reaktionsgeschwindigkeit der Substratkonzentration direkt proportional ist. Die Kombination Fetuin/Virusenzym zeigt in den ersten 5 Minuten eine steil ansteigende Gerade, die dann in einen flacheren linearen Bereich übergeht. Das würde bedeuten, daß hierbei in den ersten 5 Minuten aufgrund einer größerer Anfangsgeschwindigkeit mehr Substrat umgesetzt und erst nach dieser Zeit eine Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration sich einstellen würde.

4.2. Diskussion der Abschnitte 3.4. und 3.5.

Wie die Abbildungen 11 und 12 zeigen, entwickeln die Sendai Viren Fushimi, Obayashi, MN, Z und 6/94 unterschiedliche Aktivitäten bei der Verwendung zweier verschiedener Substrate.
Stellt man eine Reihenfolge auf, die nach abfallenden Enzymaktivitäten geordnet ist, so ergibt sich:

für Fetuin $\quad Z \geq Fu \succ MN \succ Ob \geq 6/94$

für MPN $\quad Fu \geq MN \succ Z \succ 6/94 \succ Ob$

Mit Hilfe dieser Aufstellung erkennt man, daß die Stämme Z und MN ein unterschiedliches Verhalten den Substraten Fetuin und MPN gegenüber zeigen.
Der Stamm Fu zeigt sowohl mit Fetuin als auch mit MPN die höchsten Aktivitäten. Bei diesem Virusstamm handelt es sich um ein menschliches Isolat, das durch die Maus passagiert wurde.
Die Stämme Ob und 6/94 entwickeln sowohl dem Substrat Fetuin als auch dem Substrat MPN gegenüber geringere Aktivitäten. Beide Stämme sind menschliche Isolate.
Bei den Stämmen Z und MN handelt es sich um Mäuseisolate,

wobei der erstere eine hohe Enzymaktivität mit dem Substrat Fetuin entwickelt, der andere dieselbe mit dem Substrat MPN.

Trotz der Annahme, daß bei Sendai Viren die Neuraminidaseaktivitäten und hämagglutinierenden Eigenschaften auf einem Protein (sog. großem Glykoprotein) vereinigt sind, wurden verschiedene Neuraminidaseaktivitäten gemessen, obwohl zuvor alle Stämme auf einen HA - Titer von 32 eingestellt worden waren.

Ein ähnlich abweichendes Verhalten fand sich bei den Arbeiten von Okada und Tadokoro (1962), die das Zellfusion- und Hämolyseverhalten von Parainfluenzaviren untersuchten. Diese beiden Eigenschaften sollen nach der These von Scheid und Choppin (1974) durch das sogenannte kleine Glykoprotein ausgeübt werden, während das sogenannte große Glykoprotein, wie oben angeführt, Neuraminidaseaktivität und hämagglutinierende Eigenschaft besitzt. Bei den Arbeiten von Okada und Tadokoro fand sich aber ein divergierendes Verhalten der Fusions- und Hämolyseeigenschaften von Parainfluenzaviren nachdem diese mit physikalischen Maßnahmen wie z.B. UV-Bestrahlung und Erhitzen behandelt worden waren. Diese Beobachtungen sind mit den von Scheid und Choppin postulierten Thesen nicht ganz in Einklang zu bringen. Eine Wertung dieser Diskrepanz wird erst nach dem Vorliegen weiterer Ergebnisse möglich sein.

5. Zusammenfassung

Mit den eingesetzten Testen (Fetuin Test, Folin(MPN) Test, Präzipitat(MPN) Test) lassen sich die durch die Enzyme abgespaltenen Mengen an Acetylneuraminsäure bestimmen. Der Folin(MPN) Test ist dabei der einfachere und leichter durchzuführende Test. Der Präzipitat(MPN) Test konnte nur in einem Teil der Arbeit eingesetzt werden, da bei ihm nur in einem Bereich von 5,0 µg bis 20,0 µg Acetylneuraminsäure eine Linearität zwischen Extinktion und Farbkonzentration besteht.

Bei den kinetischen Daten war auffallend, daß die gemessenen Michaeliskonstanten mit Ausnahme der Kombination Fetuin/Bakterienenzym nicht in den "biologischen" Bereich von 10^{-3} bis 10^{-5} Mol/L lagen. Dagegen zeigten die ermittelten V_{max} - Werte für die Enzym-Substrat-kombination MPN/Virusenzym recht hohe Werte. Im Vergleich dazu erreichte das Enzym-Substrat-Paar Fetuin /Bakterienenzym einen V_{max} - Wert, der um den Faktor 10 niedriger lag, als die Maximalgeschwindigkeit von MPN/Virusenzym. Somit ist anzunehmen, daß die eingesetzten Viruslösungen in geringem Umfang Verunreinigungen enthielten, die sich auf die Interaktion Enzym-Substrat hemmend auswirken konnten.

Das Substrat MPN erwies sich als einfach zu handhabende Substanz, aus der die Virusneuraminidase große Mengen Acetylneuraminsäure freisetzt. In Verbindung mit dem Folin Test ist es rasch möglich mit Hilfe von MPN Neuraminidaseaktivitäten von Viruslösungen zu bestimmen. Aufgrund der Ergebnisse von 3.3. ist auch anzunehmen, daß mit dem Substrat MPN auch bei Substratsättigung gearbeitet werden kann, was die Beurteilung und die Auswertung von kinetischen Daten vereinfachen würde.

Das Substrat Fetuin wird am besten von der Bakterienneuraminidase gespalten. Das spiegelt sich auch in der Michaeliskonstanten und in der ermittelten Maximalgeschwindigkeit wieder. Bei der Kombination Fetuin/Virusenzym ergeben sich Schwierigkeiten in der Beurteilung höherer Enzym- sowie Substratkonzentrationen.

Demnach scheinen die günstigen Enzym-Substrat-Kombinationen MPN/Virusenzym und Fetuin/Bakterienenzym zu sein.

Bei dem Vergleich der Enzymaktivitäten der Sendai Viren Fu, Ob, MN, Z und 6/94 gegenüber den Substraten Fetuin und MPN ergab sich die Reihenfolge Fu ≻ Ob ≻ 6/94 . Die Stämme Z und MN zeigten ein unterschiedliches Verhalten. Z zeigte gegenüber Fetuin die größeren Aktivitäten, MN gegenüber MPN. Obwohl die Viruslösungen auf den einheitlichen HA - Titer von 32 eingestellt waren, zeigte dies keinen Einfluß auf die entwickelten Neuraminidaseaktivitäten. Damit ist anzunehmen, daß die in einem spike vorhandenen Enzymeigenschaften und hämagglutinierenden Eigenschaften in ihrer Wirkung nicht miteinander vergleichbar sind.

Ich danke Herrn Professor Dr. V. ter Meulen für die Überlassung des Themas, sowie für die hilfreiche Förderung bei der Durchführung der Arbeit.
Ich danke Herrn Professor Dr. K. Koschel für die Übernahme des Korreferates.
Herrn Dr. W. Loh und Frau Löffler habe ich herzlich für die Unterstützung bei der technischen Durchführung der Arbeit zu danken.

6. Literaturverzeichnis

1.) Aminoff, D. 1961 Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. Biochem.J. 81, 384 - 391

2.) Balke,E., Scharmann,W., Drzeniek, R. 1974 Die Bestimmung des Molekulargewichtes bakterieller Neuraminidasen mit Hilfe der Gel-Filtration. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A. 229

3.) Blix,G., Gottschalk,A., Klenk,E., 1957 Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. Nature 179, 1088

4.) Brossmer,R., Bürk,G., et al 1974 Recent Aspects of the chemistry of N-acetyl-D-neuraminic acid. Behring Inst. Mitt. No. 55, 119 -123

5.) Bucher,D.J., Kilbourne,E.D., 1972 A_2 (N2) neuraminidase of the X - 7 influenza virus recombinant: determination of molecular size and subunit composition of the active unit. J. Virol. 10, 60 - 66

6.) Burnet, F.M., Stone, J.D., 1947 The receptor destroying enzyme of V. cholerae. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 25, 227

7.)Drzeniek, R. 1970 b Wechselwirkungen zwischen Myxoviren und Zelloberflächen. III. Neuraminidase der Myxoviren. Z. Med. Mikrobiol. Immunol. 156, 1 - 38

8.) Drzeniek, R. 1972 Viral and bacterial neuraminidases. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 59, 35 - 74 Springer Verlag Heidelberg

9.) Drzeniek, R. 1974 Neuraminidases of different Origin: characterization and biological role. Behring Inst. Mitt., No. 55, 1 - 10

10.) Dulbecco, R., Vogt, M. 1954 Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J.exp. Med. 99, 167

11.) Gottschalk, A., Lind, P.E. 1949 Product of interaction between influenza virus enzyme and ovomucin. Nature 164, 232

12.) Gottschalk, A. 1957 Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and Vibrio cholerae. Biochem. biophys. Acta 23, 645

13.) Hirst, G.K. 1942 a The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. J.Exp. Med. 75, 49

14.) Hirst, G.K. 1942 b Adsorption of influenza hemagglutinin and virus by red blood cells. J.Exp.Med. 78, 99

15.) Khorlin, A.Ya., Privalova. I.M., Zakstelskaya, L.Ya., Molibog, E.V., Evstigneeva, N.A. 1970 Synthetic inhibitors of Vibrio cholerae neuraminidase and neuraminidases of some influenza virus strains. FEBS letters 8, 17

16.) Kuhn, R., Brossmer, R. 1956 Über O-Acetyl-lactaminsäurelactose aus Kuh-Colostrum und ihre Spaltbarkeit durch Influenza-Virus. Chem.Ber. 89, 20 13

17.) Kuhn, R., Brossmer, R. 1956 Isolierung einer niedermolekularen, durch Influenza- Virus spaltbaren Substanz aus Milch. Angew. Chem. 68, 211

18.) Kuhn, R., Brossmer, R. 1958 Die Konstitution der Lactaminsäure-lactose, -Ketosidase-Wirkung von Viren der Influenza-Gruppe. Angew.Chem. 70, 25

19.) Laver, W.G., Valentine, R.C. 1969 Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus. Virology 38, 105 - 119

20.) Lazdins, J., Haslam, E.A., White, D.O. 1972 The polypeptides of influenza virus. VI. Composiotion of the neuraminidase. Virology 49, 758 - 765

21.) Lief, F.S., Loh,W., Ter Meulen, V., Koprowski, H., 1975 Antigenic variation among parainfluenza Type 1 (Sendai) viruses: analysis of 6/94 virus. Intervirology 5, 1 - 9

22.) Lineweaver, H., Burk, D.J., 1934 The determination of enzyme dissociation constants. J.Amer.chem. Soc. 56, 658

23.) Maeno, K., Yoshida, T., Iinuma, M., Nagai, Y., Matsumoto, R., 1970 Isolation of hemagglutinin and neuraminidase subunits of hemagglutinating virus of Japan. J.Virol. 6, 492 - 499

24.) Melnick, J.L. 1973 a Classification and nomenclature of viruses. Progr. med. Virol. 15, 380 - 384 Karger Verlag, Basel

25.) Melnick, J.L. 1973 b Classification and nomenclature of viruses. Progr. med. Virol. 16, 337 - 342

26.) Palese, P., Bodo, G., Tuppy, H., 1970 Quantitative determination of neuraminidase-active foci in cell monolayers cultures infected with influenza or Newcastle disease virus. J. of Virol. 6, 556 - 558

27.) Palese, P., Bucher, D., Kilbourne, E.D. 1973 Applications of a sythetic neuraminidase substrate. Appl. Microbiol. 25, 195 - 201

28.) Scheid, A., Choppin, P.W., 1973 Isolation and purification of the envelope protein of Newcastle disease virus. J.Virol. 11, 263 - 271

29.) Scheid, A., Choppin, P.W., 1974 Virology 57, 475

30.) Schulze, J.T. 1972 The structure of influenza virus. II. A model based on the morphology and composition of subviral particles. Virology 47, 181 - 196

31.) Sedmak, J.J., Grossberg, S.E. 1973 Comparative enzyme kinetics of influenza neuraminidases with the synthetic substrate methoxyphenylneuraminic acid. Virology 56, 658 - 661

32.) Spiro, R.G. J. biol. chem. 235, 2866 (1960)

33.) Tozawa, H., Watanabe, M., Ishda, N., 1973 Structural components of Sendai virus. Serological and physiochemical characterization of hemagglutinin subunits associated with neuraminidase activity. Virology 55, 242 - 243

34.) Warren, L., 1959 The thiobarbituric acid assay of sialic acid. J.biol. chem. 234, 1971

Lebenslauf

Am 2o.7.1949 wurde ich, Volker Stock, als einziges Kind des Kaufmannes Otto Stock und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Wesche, in der niedersächsischen Stadt Northeim geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule wechselte ich 1960 auf das neusprachliche und mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium Corvinianum Northeim über, an dem ich im Juni 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Ab Juli 1969 leistete ich in der Stadt-Apotheke Bad Sachsa ein zweijähriges Apothekenpraktikum ab und bestand im Juli 1971 das pharmazeutische Vorexamen in Hildesheim.

Nach weiteren zwei Jahren als Apothekenassistent erhielt ich für das Sommersemester 1973 eine Zulassung für das Fach Medizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg.

Nach dem Ablegen der ärztlichen Vorprüfung im März 1975, des ersten Abschnittes der ärztlichen Prüfung im August 1976 und des zweiten Abschnittes der ärztlichen Prüfung im August 1978 bestand ich am 6.11.79 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung und damit die ärztliche Prüfung.

Vom Sommersemester 1975 bis zum Sommersemester 1977 habe ich den versuchstechnischen Teil der vorliegenden Arbeit am Institut für Virologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Druckerei A. Staudenraus Würzburg